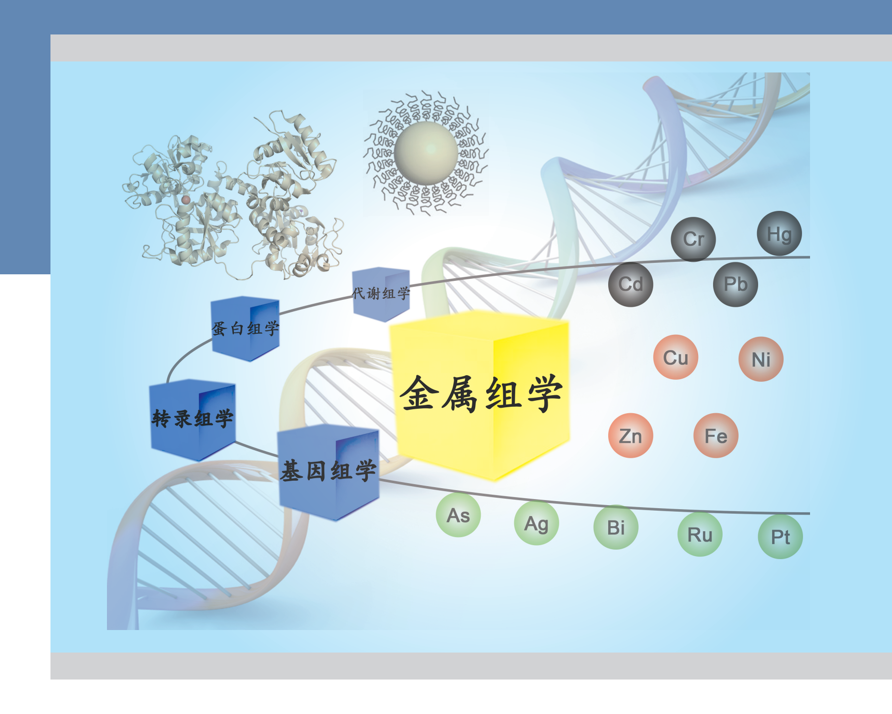
现代化学基础丛书 37

金属组学

李玉锋　孙红哲　陈春英　柴之芳　编著



科学出版社

现代化学基础丛书 37

金属组学

李玉锋　孙红哲　陈春英　柴之芳　编著

科学出版社

北京

内 容 简 介

金属组学是继基因组学、蛋白质组学、代谢组学之后，于2002年逐渐发展起来的一门研究生命体内自由或络合的全部金属元素的分布、含量、化学种态及其功能的综合学科。本书是我国第一部全面介绍金属组学及其研究领域的系统性专著。全书共六章，分别介绍金属组学及其研究内容、分析方法学、金属组学与其他学科的交叉、环境金属组学、纳米金属组学及我国金属组学研究进展。

本书可供生物化学、无机化学、生物无机化学、分析化学、环境化学、纳米科学与技术、蛋白质组学、基因组学、代谢组学等学科的研究人员以及高等院校和科研院所相关专业的师生参考。

图书在版编目（CIP）数据

金属组学/李玉峰等编著. —北京：科学出版社，2016.5

（现代化学基础丛书 37）

ISBN 978-7-03-048241-9

Ⅰ. ①金…　Ⅱ. ①李…　Ⅲ. ①金属学　Ⅳ. ①TG11

中国版本图书馆 CIP 数据核字（2016）第 096027 号

责任编辑：张淑晓　李　洁　高　微 / 责任校对：贾娜娜

责任印制：赵　博 / 封面设计：铭轩堂

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码：100717

http://www.sciencep.com

北京文林印务有限公司印刷

科学出版社发行　各地新华书店经销

*

2016年5月第　一　版　　开本：720 × 1000 1/16

2016年5月第一次印刷　　印张：7

字数：141 000

定价：50.00 元

（如有印装质量问题，我社负责调换）

序

金属组学（metallomics）是继基因组学、蛋白质组学和代谢组学之后提出的一种新的“组学”研究方向，其目标是阐明生物体中金属参与的生物分子的组成、结构、功能以及在生命体系中的作用。金属组学研究涉及分析化学、生物无机化学、化学生物学、药物化学以及临床医学等诸多学科，是一个多学科交叉的研究领域。

“金属组学”的概念最早由日本学者 Haraguchi 于 2002 年提出。2007 年在日本召开了第一届国际金属组学会议，此后每两年召开一次。2009 年，英国皇家化学会创办了 *Metallomics* 杂志，刊登该领域的研究进展和研究技术。英国皇家化学会（RSC 2004、2007）、国际纯粹与应用化学会（IUPAC 2009）还分别出了专辑，介绍金属组学研究领域的进展。RSC 于 2010 年出版了专著 *Nuclear Analytical Techniques for Metallomics and Metalloproteomics*，介绍了金属组学研究中涉及的各种分析方法以及该领域的新成果。在过去的几年里，分析化学和化学生物学方法学的发展和实验技术手段的提高，极大地促进了金属组学研究的进步，使得这门新的学科方向快速发展且日渐成熟。

我国的金属组学研究一直与国际同步，经过十几年的努力取得了长足的进展，出现了若干优秀的研究团队。特别是中国科学院高能物理研究所的团队，长期致力于发展金属组学方法学并解决生物、环境以及纳米科学领域内与金属组学研究相关的问题，其一直处于这一领域的国际领先行列。李玉锋、孙红哲、陈春英及柴之芳等组织国内该领域优秀学者撰写的这本书，系统总结国内外金属组学研究领域的最新成果，对读者全面了解这一领域的历史、现状和未来发展以及我国学者在这一研究领域的贡献很有帮助，是一本很好的入门专著。

在该书中作者还展望了未来金属组学的发展，强调该领域发展有赖于现代分离分析技术的进步，包括完善适合金属蛋白提取的样品制备和分离技术，发展新型的分析检测方法等。特别是同步辐射光源的发展以及 X 射线光学技术的引入，能为我们提供亮度更高、光斑更小的同步辐射光，提高生物体系内微量元素的定位、定量和形态分析能力。此外，发展重要生物分子的纳米探针，跟踪其胞内过程，在关键细胞生物学过程研究中也十分重要。该书还指出，目前金属组学研究主要以分析化学和生物无机化学为主，今后应注重加强与生物、医学、环境等学

科的融合，选择有重大科学意义或有迫切需求的现实问题开展研究，取得重要的研究成果，促进金属组学的更快发展。

综上所述，该书是一本介绍金属组学及其应用的较为深入和全面的著作，对读者了解这一领域的全面发展有重要的参考价值，是一本值得深入阅读的好书。

清华大学化学系

2015 年 12 月

前　言

金属组学是系统研究生命体内，特别是一种细胞内，自由或络合的全部金属元素的分布、含量、化学种态及其功能的一门交叉学科。自 2002 年 Haraguchi 教授提出“金属组学”概念，特别是他在随后发表的文章中做了进一步阐述之后，金属组学研究受到了国内外学者的高度关注：英国皇家化学会（RSC）先后出版了两期专辑，报道了金属组学研究进展，并于 2009 年创立 *Metallomics* 杂志；国际纯粹与应用化学会（IUPAC）于 2009 年出版了金属组学专辑，并于 2010 年发布了金属组学及金属组的定义，从而确立了金属组学这一新兴交叉学科。与此同时，自 2007 年开始，每两年一次的国际金属组学会议也已分别在日本、美国、德国、西班牙及我国召开。另外，国际上第一个金属组学研究中心——美洲金属组学研究中心也已在美国辛辛那提大学成立。

2010 年，应英国皇家化学会邀请，我们联合有关专家编纂出版了 *Nuclear Analytical Techniques for Metallomics and Metalloproteomics* 一书，该书系统介绍了如何利用先进核分析技术开展金属组学和金属蛋白质组学研究。该书出版后至今，金属组学又有了新的发展，与其他学科有了更广泛的交叉。2015 年，在成功主办了第五届国际金属组学会议后，我们萌生了编纂一本书，系统介绍金属组学及其最新进展的想法，这部专著一方面可以对国际上金属组学研究进展进行总结，另一方面还可以着重介绍我国学者在金属组学研究的进展。我们就这一想法与科学出版社的同仁交流之后，他们也非常感兴趣，于是就有了读者手中的这本《金属组学》。

本书共六章，包括金属组学及其研究内容、分析方法学、金属组学与其他学科的交叉、环境金属组学、纳米金属组学及我国金属组学研究进展。其中，第 1 章由李玉锋、高愈希、陈春英和柴之芳执笔；第 2 章由赵甲亭、李玉锋和高愈希执笔；第 3 章由王海波、王宇传和孙红哲执笔；第 4 章由胡立刚、何滨和江桂斌执笔；第 5 章由李玉锋、王黎明、陈春英和柴之芳执笔；第 6 章由王宇传和李玉锋执笔。

本书编著者得到了国家自然科学基金委员会、国家科学技术部、中国科学院、香港研究资助局及香港大学的资助。李玉锋特别感谢王宽诚教育基金会、中国科学院青年创新促进会（2011017）的资助，陈春英特别感谢国家自然科学基金委员会杰出青年科学基金（11425520）资助。

清华大学张新荣教授与本书编著者之一柴之芳院士作为共同主席成功主办了第五届国际金属组学会议，张教授也十分关注金属组学研究并欣然为本书作序，在此表示衷心感谢！

由于我们学识浅薄，书中不妥之处在所难免，恳请各位专家、学者不吝指正。

编 者

2016 年 1 月于北京

目　　录

第 1 章　金属组学及其研究内容

组学（omics）源自英文词根“组（-ome）”，“组”表示一类个体的系统集合，因此，组学研究就是从整体着眼研究一类个体，从全局找变量，是一种自上而下的研究方法。例如，基因组学（genomics）主要研究生物系统的基因结构组成，即 DNA 的序列和表达[1]；蛋白质组学（proteomics）主要研究由生物系统表达的蛋白质及由外部刺激引起的差异[2]；代谢组学（metabolomics）则研究生物体（包括细胞、组织或个体）在不同条件下所产生的代谢产物的变化[3]。分子生物学中，组学还包括转录组学（transcriptomics）[4]、脂类组学（lipidomics）[5]、免疫组学（immunomics）[6]、糖组学（glycomics）[7]和 RNA 组学（RNomics）[8]等。

1.1　金属组学的提出

生命体系中 99.9%的物质由碳、氢、氧、氮、磷、硫、氯、钾、钠、钙和镁等 11 种元素组成，这些元素的含量占生物体总质量的 0.01%以上，称为宏量元素。与之相对应，其余低于 0.01%的元素称为微量元素。微量元素（主要为金属及类金属元素）的含量虽然非常低，却是生命存在的重要物质基础之一，它们作为活性中心或结构中心参与构成了体内 30%左右的蛋白质和 50%～70%的酶。例如，DNA 及 RNA 的合成离不开 DNA 和 RNA 聚合酶（含锌酶）的催化；在体内扮演不同角色的过氧化氢酶、固氮酶、铁传递蛋白及细胞色素等蛋白质（酶）的活性中心均含有数量不等的铁原子[9]。表 1-1 总结了一些典型的金属蛋白/金属酶的分子质量、含金属原子数目及其生物学功能[10]。由表 1-1 可以看出，这些具有基因（DNA、RNA）合成、药物代谢及抗氧化等作用的典型金属蛋白/金属酶活性中心均含有一定数目的金属原子。

表 1-1　典型金属蛋白/金属酶及其生物学功能[10]

金属蛋白/金属酶	英文名称	分子质量/kDa	含金属原子及其数目	生物学功能
转铁蛋白	transferrin	66～68	2Fe	转运铁
铁蛋白	ferritin	473	1Fe	储存铁
过氧化氢酶	catarase	225	4Fe	分解 H_2O_2
固氮酶	nitrogenase	200～220	24Fe，2Mo	固氮
细胞色素酶	cytochrome P-450	50	1Fe	代谢甾类及其他药物

续表

金属蛋白/金属酶	英文名称	分子质量/kDa	含金属原子及其数目	生物学功能
碳酸酐酶	carbonic anhydrase	30	1Zn	H_2CO_3反应催化剂
羧肽酶	carboxypeptidase	34	1Zn	羧基端肽键水解
乙醇脱氢酶	alcohol dehydrogenase	150	4Zn	乙醇脱水
碱性磷酸酶	alkaline phosphatase	89	3.5Zn	磷酸酯水解
DNA 聚合酶	DNA polymerase	109	2Zn	DNA 合成
RNA 聚合酶	RNA polymerase	370	2Zn	RNA 合成
蓝色素形成酶	plastocyanine	134	1Cu	电子转移
谷胱甘肽过氧化物酶	gluthathionperoxidase	76～92	1Se	分解 H_2O_2 和超氧化物
脲酶	urease	480	10Ni	将尿素转化为氨

除上面提到的有益微量元素外，还有有毒金属或类金属元素如汞、镉、铅、铬、砷、锡等，可引起严重的环境健康问题，因此人们也开展了大量研究，但这些工作只是针对特定的一种元素开展其在机体内元素含量、形态及与某种生物效应的相关性研究，缺乏总体的针对所有金属或类金属的研究。

鉴于金属及类金属元素在生物体系中的重要性，受基因组学和蛋白质组学等研究方法的启发，2002 年，Haraguchi 提出了系统研究细胞、器官或生物组织中金属或类金属元素的新的研究方向——金属组学（metallomics），它是系统研究生命体内，特别是一种细胞内，自由或络合的全部金属元素的分布、含量、化学种态及其功能的综合学科[11]。与之相对应，细胞、器官或组织中金属及类金属蛋白、酶或其他含有金属的生物分子及游离金属、类金属离子的集合则称为金属组（metallome），即金属组指一个生物体系中的所有含金属物种[10]。金属组学中的金属元素，不仅包括与蛋白质和酶结合的生物金属，还包含金属-核酸、金属-小分子配体（有机酸、氨基酸等）、金属-多糖以及不同价态自由离子等所有存在形式的金属元素，金属组学研究对于全面阐述金属元素在生物体内的富集和代谢机理及其生物功能，对于理解各种重要的生物学现象具有重要意义。

2010 年，国际纯粹与应用化学会（IUPAC）发布了对金属组和金属组学的定义[12]：金属组是指生物体系中所有的金属或类金属的种态和/或总量。需要强调的是：

（1）金属组可以通过测定能够代表生物体系（或其组成部分）或特定部位的生物样品来确定。

（2）金属组可以通过如下具有不同程度近似的参数来表征，如体系内所有元素的浓度、所有与特定配体（蛋白质或代谢物）结合的金属的总量、特定元素的所有物种（如铜金属组）等。

（3）与基因组测序确定的 DNA 序列不同，金属组只能通过确定热力学平衡常数来描述。

金属组学研究生物体系中金属组，包括研究金属离子或其他金属种态与基因、蛋白质、代谢物质及其他生物分子的相互作用和功能关系。

（1）金属组学重点关注生物体系中的金属元素（如铜、锌、铁、锰、钼、镍、钙、镉、铅、汞、铀……）或类金属元素（如砷、硒、锑）等。

（2）金属组学旨在阐明一系列元素含量或形态与基因组的联系。这种联系可以是统计性的（某一特定基因的存在可导致某一元素含量的富集）、结构性的（某一金属蛋白的序列与某一基因相关）或功能性的（某一生物配体的存在是由某一基因编码造成的）。

（3）金属组学是一种综合性研究方法。对于单一金属物种的鉴别，无论其多么重要，只要未阐述其对体系的贡献或重要性，都不应当看作是金属组学研究。

金属组学是继基因组学、蛋白质组学和代谢组学之后提出的一种新的组学。金属组学研究不仅解答生物体的金属与蛋白质结合的化学组成问题，而且为探讨金属蛋白等生命物质担负生命活动的机理开辟新的研究途径。图 1-1 展示了生物体系中基因组学、蛋白质组学、代谢组学和金属组学间的关系。基因组学研究的是编码核碱基序列的 DNA 和 RNA 的遗传信息。此种 DNA 和 RNA 在基因组学中通常称为基因组，它们在蛋白质合成中起着重要的作用。蛋白质则分布在细胞内外，它们起着促进细胞内各种生物物质合成和代谢的酶的作用。而许多生物物质和金属离子都作为原料物质通过膜而被输送到细胞内。通常在膜和细胞内都会发生这些物质的活跃转换，而这种物质转换和传输出细胞的过程则称为新陈代谢。在新陈代谢过程中产生的通常都是像氨基酸、有机酸和金属离子这样一些小分子的生物物质，近来它们已被称为代谢组（metabollomes）或者代谢物（metabolite）。业已证明，许多元素在各种生物体系中起着重要作用。实际上，在生物体液和器官中，大多数痕量金属都是与各种蛋白质相结合，称为金属蛋白（metalloprotein）。当金属蛋白在生物细胞和器官中起调节生物反应和生理学功能的生物催化剂作用时，它们就被称为金属酶（metalloenzyme）。基因组学和蛋白质组学确实都是具有基本重要性的科学领域，因为基因都含有各种蛋白质合成的遗传信息编码。但是，没有含锌和其他金属的金属酶的帮助，基因和蛋白质都无法合成。就科学意义而论，金属组学与基因组学和蛋白质组学将可占据同样重要的位置。因此，在金属组学中，与生物金属结合的生物分子称为金属组。另外，体液中大多以游离形式存在的碱金属和碱土金属离子也应该包括在金属组中，因为它们对于生物体系中生理功能的存在起着十分重要的作用[10，13]。

金属组学的提出已经引起了学术界的广泛关注，国际上金属组学研究进展十分迅速，不论基础理论还是技术方法，都在不断进步和完善。目前，英国皇家化学会刊物 *Journal of Analytical and Atomic Spectrometry* 分别于 2004 年和 2007 年发

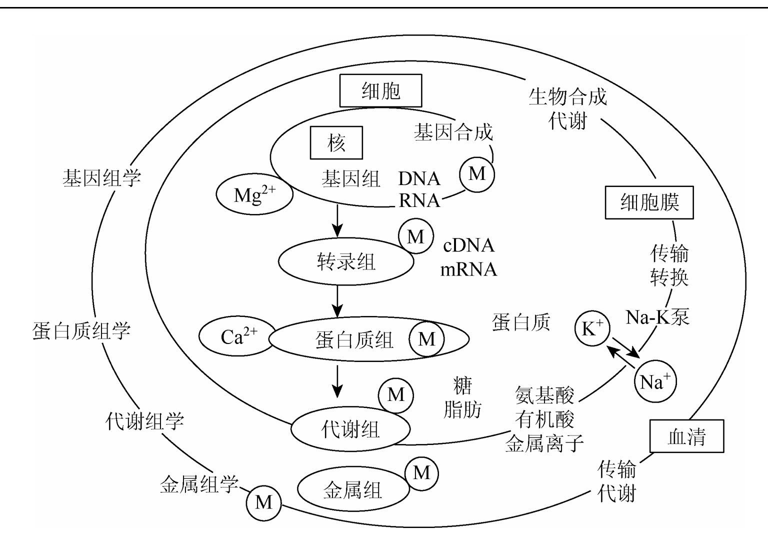


图 1-1　生物体系中基因组学、蛋白质组学、代谢组学和金属组学间关系示意图[10, 13]

行了两期金属组学专辑[14]，同时该刊还建立了金属组学与生物元素形态分析网站（http://www.rsc.org/Publishing/Journals/JA/News/biological_content.asp）。2007 年年底，首届国际金属组学会议于日本名古屋举办，来自世界各地的约 400 专家学者与会，之后 2009 年、2011 年及 2013 年第二届至第四届国际金属组学会议分别于美国、德国和西班牙举办。第五届国际金属组学会议于 2015 年在我国北京召开（http://metallomics.antpedia.com）。国际上第一个金属组学研究中心——美洲金属组学研究中心已于美国辛辛那提大学成立。此外，英国皇家化学会于 2009 年 1 月开始发行名为 *Metallomics* 的刊物，这是金属组学研究领域的第一本也是唯一一种专业性期刊（http://www.rsc.org/Publishing/Journals/MT/ index.asp），为金属组学学科的发展提供了一个良好的平台。

国内学者也给予金属组学较大的关注。江桂斌等[15]于 2005 年对金属组学的概念进行了介绍，并对金属组学的研究方法特别是金属组的分离与检测方法进行了总结。2008 年 4 月，金属组学与金属蛋白质组学研讨会于北京成功举行，来自法国国家科学研究院（CNRS）、丹麦技术大学（DTU）及我国的香港大学、北京大学医学部、复旦大学、厦门大学、中国科学院生态环境研究中心、国家纳米科学中心以及中国科学院高能物理研究所等多家单位的科研人员报告了各自在金属组学领域的最新进展（http://www.ihep.ac.cn/news/news2008/080504.htm）。2013 年，*Metallomics* 杂志推出了由香港大学孙红哲教授组织的“中国的金属组学研究进展”专辑[16]。该专辑共收录了 21 篇我国科学家关于金属组学研究的文章，内容涵盖了金属组学在生物学、生物化学、环境科学、分子生物学、毒理学及医学中的应用，展示了金属组学研究在我国的蓬勃发展。

1.2　金属组学的研究内容

金属组学的研究对象是生命体系中所有金属元素，因此，金属组学也可称为金属辅助的功能生物化学（metal-assisted functional biochemistry）。结合金属元素在生命体系中的作用，Haraguchi 提出，金属组学的研究内容至少包括如下内容[10]：

（1）生物体液、细胞、器官中元素的含量分析。

（2）生物体系中元素的形态分析。

（3）金属组的结构分析。

（4）应用模型络合物阐释金属组反应机理。

（5）金属蛋白和金属酶的鉴定。

（6）生物分子和金属的代谢研究。

（7）基于多元素分析的、与微量元素相关的疾病的诊断。

（8）化学治疗中的无机药物的设计。

（9）地球上生命体系的化学演变。

（10）医学、环境科学、食品科学、农业、毒理学、生物地球化学中的其他金属辅助功能性生物科学等。

金属组学研究的一些重要研究领域包括但不局限于如下内容[17]。

1. 生物催化

我们知道，生命活动过程中的光合作用、呼吸作用及固氮过程均需要以金属作催化中心的酶的作用。这些酶中的金属或以水合离子形式（如 Co^{2+}、Cu^{2+}、Fe^{2+}、Fe^{3+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Ni^{2+}、Zn^{2+}等）或以辅基形式［如血红素（含铁）、钼喋呤及钴胺素（维生素 B_{12}）等］或通过共价键形式［如谷胱甘肽过氧化物酶中的硒代半胱氨酸（selenocysteine，SeCys）］组成酶的活性中心。生命过程对这些金属的选择既取决于这些金属本身的特性，如氧化还原电势及配位能力，也取决于环境中这些金属的可利用度。生物催化中，Mg^{2+}、Zn^{2+}等金属离子通过增加反应物的亲电性、酸性或亲核性或促进异裂反应等方式实现非氧化还原催化功能，而 Cu^{+}/Cu^{2+}、Fe^{2+}/Fe^{3+}、Mn^{2+}/Mn^{3+}及 Mo^{4+}/Mo^{6+}等离子对广泛存在于氧化还原催化过程中[18]。研究生命过程中这些金属酶的检测、定量、分离与表征是微生物学、动植物生物化学及临床化学等多学科领域的一个重要课题。

2. 生物地球化学和环境化学

金属是联系造就生命的大气、海洋化学与生物体基因组、蛋白质组的纽带。生命进化的一个重要方面是机体主动适应环境变化以保护其还原性细胞质内环境

并从环境中获得必需元素[19]。Zerkle 等[20]利用整体基因测序方法研究了原核生物体内地球化学特征与生物进化的关系，并试图利用这一特点研究生物进化过程中的地球化学特征。Dupont 等[21]进一步利用结构信息学和全基因组测序方法重构了 Fe、Zn、Mn 及 Co 结合蛋白，发现不同地质年代的蛋白质中微量金属含量与其生物可利用度相关联。

系统研究金属元素在特定生态环境中的代谢情况需要理解生物如何感知、适应和利用这些金属元素。环境中的金属元素污染会造成某些蛋白质表达的升高，因此可利用这些蛋白质作为环境污染的生物指示物，这也是环境蛋白质组学的重要研究内容[22]。

3. 植物生物化学与生理学

在植物生物化学与生理学中，人们非常关注土壤中低溶解度金属的活化，金属离子在植株内的转运，以及金属离子在细胞液或其他部位的储存机理等。鉴于此，人们致力于鉴定和量化小分子金属代谢物的研究：

（1）必需元素，特别是 Fe 和 Zn 等的吸收和生物利用机理。这些研究有助于实现必需元素尽可能多地向籽粒或其他可食用部位转移，这样可以减少人体营养不良状况的发生，而世界上有超过一半的人口处于营养不良状态，这种现象在发展中国家尤为突出[23]。

（2）植物修复、植物冶金中的金属富集机理[24]。有些植物可以吸收并在体内特别是地上部分蓄积对其他物种为有毒剂量水平的金属离子而不表现出毒性，因此，可利用植物修复的方法去除土壤或水体中的重金属，也可利用植物提取的方法提炼贵金属（即植物冶金法）。

（3）植物抵御重金属暴露的机理，特别是如何通过蒸发、形成不溶性无机化合物或诱导形成植物螯合素的机理[25]。金属组学要重点关注植物代谢组及相应的基因、酶的分析方法。

4. 临床化学

尽管金属离子作为调节因子在生命过程中起着重要的作用，但金属也会表现出剧毒性或与不少疾病的发生关联紧密。大多数与铜、铁及锌相关的疾病是由于编码金属转运蛋白的基因发生了突变，而这些突变可以通过蛋白质组学方法进行鉴定[26, 27]。人们可以通过测定金属蛋白或金属蛋白酶的含量来确认某一疾病，跟踪该疾病的发展情况并评价所用治疗药物的效果。例如，基质金属蛋白酶是一类与锌相关的蛋白酶，它可以降解细胞外基质成分，如胶原蛋白等。有报道认为，它可以用作心血管疾病的诊断指示物[28]。目前，基质金属蛋白酶含量的测定主要是利用繁杂的免疫分析法获得，而金属组学的方法很有可能是另一种更

简便的方法。

不少药物的分子结构中含有金属，因此这些药物也可称为金属药物，这些金属药物具有抗癌（如顺铂或钌类药物等）、抗风湿（金）、治疗胃病（铋）等功能[29]。金属组学方法可以研究这些药物的代谢、转运或者与体内相关分子的结合情况。

5. 营养学及必需微量元素补充剂研究

鉴于微量元素所起的重要作用，特别是它们有可能用于疾病预防等，一些膳食中缺乏这些微量元素的地区正考虑通过向膳食或动物饲料中添加微量元素而提高机体内微量元素水平。一个典型的例子是硒[30]，人们通常通过服用经过富硒培养的酵母增加体内硒的含量，而市场上已经有大量含锌、铁、锰及铬等微量元素的补充剂销售。金属组学可以在如下方面开展工作：

（1）表征补充剂中金属元素的化学种态和生物可利用度。相关法律法规要求补充剂中任何超过总量 0.1%的种态都需要表征。元素的形态特征可用于产品溯源，还可用于控制利用生物技术生产补充剂过程中的质量控制。

（2）研究微量元素补充剂在动物和人体中的转运与转化情况。例如，饲喂富硒产品的动物的肉、奶及蛋类产品本身可用作功能食品，研究这些富硒产品中硒的含量、形态有助于人们更好地利用这些功能食品[31]。

总而言之，金属组学涵盖众多学科领域，它的最终目标是系统地阐明金属、类金属元素在生物体系中的吸收、转运、功能及代谢机理。

（李玉锋　高愈希　陈春英　柴之芳）

参 考 文 献

[1] 宋方洲. 基因组学. 北京：军事医学科学出版社，2011.

[2] 钱小红，贺福初. 蛋白质组学：理论与方法. 北京：科学出版社，2003.

[3] 许国旺. 代谢组学——方法与应用. 北京：科学出版社，2008.

[4] 斯卡瑟里. 基因组学、转录组学与代谢组学. 北京：科学出版社，2007.

[5] 马小琼，刘广义，杨军. 脂类组学及神经脂类组学进展. 中国药理学与毒理学杂志，2008，（2）：156-160.

[6] 马大龙. 免疫组学：21 世纪免疫学家的新挑战. 中华微生物学和免疫学杂志，2005，（9）：697-700.

[7] 李铮. 糖组学研究技术. 北京：高等教育出版社，2015.

[8] 冷方伟. 非编码 RNA 与 RNA 组学研究现状及发展态势. 生物化学与生物物理进展，2010，（10）：1051-1053.

[9] Mertz W. The essential trace elements. Science，1981，213（4514）：1332-1338.

[10] Haraguchi H. Metallomics as integrated biometal science. J Anal At Spectrom，2004，19（1）：5-14.

[11] Haraguchi H，Matsuura H. In chemical speciation for metallomics，Proceedings of International Symposium on Bio-Trace Elements 2002（BITRE 2002）Wako，2003；Enomoto S，Seko Y. The Institute of Physical and Chemical Research（RIKEN）：Wako，2003：3-8.

[12] Lobinski R，Becker J S，Haraguchi H，et al. Metallomics：Guidelines for terminology and critical evaluation of analytical chemistry approaches（IUPAC Technical Report）. Pure Appl Chem，2010，82（2）：490-504.

[13] 金伟，牟颖，金钦汉. 金属组学、代谢组学及其. 理化检验-化学分册，2005，41（4）：296-299.

[14] Koppenaal D W，Hieftje G M. Metallomics—The future of atomic spectroscopy？J Anal At Spectrom，2007，22（2）：111.

[15] 江桂斌，何滨. 金属组学及其研究方法与前景. 中国科学基金，2005，19（3）：151-155.

[16] Sun H. Metallomics in China. Metallomics，2013，5（7）：782-783.

[17] Mounicou S，Szpunar J，Lobinski R. Metallomics：The concept and methodology. Chem Soc Rev，2009，38（4）：1119-1138.

[18] Andreini C，Bertini I，Cavallaro G，et al. Metal ions in biological catalysis：From enzyme databases to general principles. J Biol Inorg Chem，2008，13（8）：1205-1218.

[19] Williams R J P，Fraústo da Silva J J R. The trinity of life：The genome，the proteome，and the mineral chemical elements. J Chem Educ，2004，81（5）：738-749.

[20] Zerkle A L，House C H，Brantley S L. Biogeochemical signatures through time as inferred from whole microbial genomes. Am J Sci，2005，305（6-8）：467-502.

[21] Dupont C L，Yang S，Palenik B，et al. Modern proteomes contain putative imprints of ancient shifts in trace metal geochemistry. Proc Natl Acad Sci USA，2006，103（47）：17822-17827.

[22] López-Barea J，Gómez-Ariza J L. Environmental proteomics and metallomics. Proteomics，2006，6（S1）：S51-S62.

[23] Mayer J E，Pfeiffer W H，Beyer P. Biofortified crops to alleviate micronutrient malnutrition. Curr Opin Plant Biol，2008，11（2）：166-170.

[24] Shah K，Nongkynrih J M. Metal hyperaccumulation and bioremediation. Biol Plant，2007，51（4）：618-634.

[25] Clemens S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. Planta，2001，212（4）：475-486.

[26] Kulkarni P P，She Y M，Smith S D，et al. Proteomics of metal transport and metal-associated diseases. Chem Eur J，2006，12（9）：2410-2422.

[27] Thierse H J，Helm S，Pankert P. Metalloproteomics in the molecular study of cell physiology and disease. In Posch A. 2D PAGE：Sample Preparation and Fractionation. New York：Humana Press，2008.

[28] Lopez-Avila V，Spencer J V. Methods for detection of matrix metalloproteinases as biomarkers in cardiovascular disease. Clin Med Cardiol，2008，2：75-87.

[29] Guo Z，Sadler P J. Metals in medicine. Angew Chem Int Ed，1999，38（11）：1512-1531.

[30] Schrauzer G N. Selenomethionine：A review of its nutritional significance，metabolism and toxicity. J Nutr，2000，130（7）：1653-1656.

[31] Rayman M P. The importance of selenium to human health. Lancet，2000，356（9225）：233-241.

第 2 章　分析方法学

本章系统地总结金属组学研究中的各种分析技术，包括各种高通量金属组学分析技术、金属蛋白质组学技术，并对这些方法的特点和局限性作简单说明。

2.1　高通量金属组学分析技术

组学研究方法的最大特点是高通量（high-throughput），金属组学的研究方法必须能够同时检测多种金属组（含量、分布及其相互作用等）或一种金属的多种形态。根据金属组学研究内容可以看出，金属组学的研究方法包括：高通量金属组定量分析技术，高通量金属组空间分布研究方法，高通量金属组形态分析方法，以及高通量金属组结构分析方法等[1]。

2.1.1　高通量金属组定量分析技术

基于等离子体（plasma）技术的仪器如电感耦合等离子体发射光谱仪（ICP-OES）及电感耦合等离子体质谱仪（ICP-MS）是高效、高灵敏度的多元素定量分析技术，因而非常适合金属组学研究。相对而言，ICP-OES 测定灵敏度较低，选择性也较差，而 ICP-MS 的检测限可达 pg/g 级，比 ICP-OES 高 2～3 个数量级[2]。对 ICP-MS 而言，液体和气体样品可以直接进样，对固体样品也可通过激光烧蚀（laser ablation，LA）技术进行直接测试，所以 ICP-MS 的测试范围很广[3]。由于 LA-ICP-MS 具有数据采集快、样品前处理少及灵敏度高等优点，目前已广泛应用于复杂的生物样品、环境样品及地质样品中元素的测定。

中子活化分析（neutron activation analysis，NAA）是另一种重要的多元素定量分析技术，它可以同时测定样品中多达 30 种元素的含量。它的检测限可低至 10^{-13}～10^{-6}g/g[4]。中子活化分析的基本原理是，样品中的稳定核素（^{A}Z）在入射中子流的作用下发生中子捕获反应，生成放射性核素（$^{A+1}$Z），$^{A+1}$Z 具有一定的半衰期，它衰变时会发射 β 粒子和 γ 射线。利用高分辨的 γ 射线谱仪检测样品受中子照射后产生的 γ 射线的强度即可实现对样品中元素的定性或定量分析。中子活化分析技术的一个最大优点是基质干扰非常少，这是因为无论是探针（中子流）还是分析信号（γ 射线）都与样品中的其他元素不发生作用。另外，由于不涉及样品消化或溶解，可最大程度地避免试剂或实验室的污染[4]。

因此，ICP-MS、NAA 均为优异的多元素分析技术，NAA 更可实现固体样品的非破坏性分析，而配备了激光烧蚀系统的 ICP-MS 同样也可实现该目标。在获得样品中不同元素的含量后，可以对其进行相关性分析，从而可以发现不同元素间的相互关系。例如，人们发现无机汞暴露的鱼类，海洋哺乳动物或海鸟，动物及人类体内硒与汞含量具有正相关，而这种相关性的发现有助于人们进一步研究硒与汞的协同或拮抗作用研究[5]。

2.1.2　高通量金属组空间分布研究方法

除了金属组的总含量研究，金属组的空间分布研究同样非常重要，因为研究金属组的分布有助于了解金属组的生物可利用度及其在生物体系内转移、功能等。研究金属组分布的技术包括：①基于 X 射线荧光技术的同步辐射 X 射线微区荧光分析（SR-μXRF）；②基于质谱技术的激光烧蚀-电感耦合等离子体质谱（LA-ICP-MS）与二次离子质谱（SIMS）等。

X 射线荧光分析（XRF）是一种多元素分析技术。当高能 X 射线与原子发生碰撞时，逐出一个内层电子使整个原子体系处于激发态，激发态原子寿命为 10^{-12}～10^{-14}s，如果较外层的电子跃入内层空穴，所释放的能量以辐射形式放出，便产生特征 X 射线荧光，可利用 X 射线荧光的能量（波长）进行元素定性分析。此外，X 射线荧光的强度与相应元素的含量有一定的关系，据此可以进行元素定量分析[6]。用狭缝或聚焦系统可以控制入射 X 射线光斑的大小，这使得 XRF 拥有独特的微区扫描能力，据此能提供元素的二维分布信息。

若采用高能质子流作为激发光而进行荧光分析，则称之为质子激发 X 射线荧光分析（PIXE），PIXE 具有比 XRF 更高的灵敏度[7]。XRF 中的 X 射线若采用同步辐射光，则可实现绝对检测限 10^{-12}～10^{-15}g，其相对检测限为几 μg/g，甚至可达 ng/g 水平[8]。XRF 主要为元素定性技术，但也可实现对元素的定量研究[9]。

SR-μXRF 是目前研究金属组分布的最热门的技术之一。通过聚焦系统，如 K-B 镜（Kirkpatrick-Baez mirror system）、Fresnel 波带片（Fresnel zone plate）等的调节，可将光斑大小调节到微米甚至是纳米级水平，这样就可以研究小到细胞水平上的金属组分布特征。例如，Carmona 等利用 K-B 镜将同步光源聚焦至 90nm 后研究了多巴胺能细胞株中金属组的分布[10]。他们发现，多巴胺囊泡中的铁主要以颗粒状分布于神经突及神经末梢，另外，他们发现，不同细胞的神经突均蓄积铜、锌甚至是铅元素。但能实现纳米级分辨率的 XRF 实验装置目前尚只有欧洲 ESRF（European Synchrotron Radiation Facility）及美国 ALS（Advanced Light Source）等少数几家，多数 SR-μXRF 的分辨率在微米级，例如，Gao 等[11]利用 SR-μXRF 对暴露于纳米铜的线虫模型中元素分布进行了研究，发现经纳米铜暴露后，线虫体内铜、钾元素含量明显增加，而且铜在体内的分布也发生改变。He 等[12]

利用同步辐射 X 射线荧光及 ICP-MS 技术研究了稀土长期暴露 6 个月后对大鼠脑中微量元素分布的影响，发现 40mg/kg 剂量组大鼠经稀土氯化镧和氯化镱长期暴露后，稀土 La 和 Yb 有明显的蓄积，提示稀土可通过血脑屏障进入大脑，同时脑中 Mg、Ca、Fe、Cu、Zn、Mn、Co 等微量元素的分布发生了变化。此外，稀土在血清、肝脏和骨头中都有蓄积，而且 Mg、Ca、Fe、Cu、Zn、Mn、Co 等元素的分布也发生了变化。对样品进行线扫描（一维）或面扫描（二维）可得到细胞、组织或器官切片中金属组分布的信息，但这些信息均基于对样品表面扫描的结果。要获得样品的立体信息，就需要对其进行三维扫描（3D SR-XRF）。利用共聚焦系统可实现样品的三维扫描，其深度分辨率可达 10～40μm，而其检测限可达亚 mg/kg 级[13]。除 3D SR-XRF 外，同步辐射微束荧光 CT（SR-XRF computerized tomography）同样可实现样品的三维扫描，其空间分辨率为 1～2μm[14]。

X 射线荧光还可与电镜如透射电镜（TEM）或扫描电镜（SEM）结合，用于测定拟南芥的根、茎，小鼠肝组织及锥体神经元中金属的空间分布研究[15, 16]。虽然 SEM-EDX 及 TEM-EDX 的分辨率可达 10nm 左右，但其检测限较差，在 g/kg 水平[17]，不适用于生物样品中微量元素研究。

利用微区扫描 PIXE 同样可研究动植物组织及人血细胞、肿瘤细胞中金属组的分布[18-20]。同时，利用共聚焦技术，三维微区扫描 PIXE 也已研制成功，通过检测由 3MeV 质子流激发产生的 Ti-K 特征 X 射线发射谱线（4.558keV），其空间分辨率可达 4μm[21]。

与 XRF 相比，质谱技术最大的优势在于更低的检测限，LA-ICP-MS 的检测限为亚 mg/kg 级，分辨率同样可达到 10μm[17]。因此，目前 LA-ICP-MS 已广泛应用于地学[22, 23]、生物样品（如植物叶子、蛇尾、树年轮、大鼠脑、人脑切片及人牙齿）的金属组分布研究[24, 25]。

二次离子质谱（SIMS）是用质谱法分析由几千电子伏特能量的一次离子打到样品靶上溅射产生的正、负二次离子的方法。其主要优点是可以分析包括氢、氦在内的几乎全部元素（不易离子化的稀有气体元素除外）及其同位素，其检测限为 ng/kg 水平，分辨率为 10μm[26]。SIMS 是一种局部破坏性技术，不适合一些活的生物样品的检测，但也有人利用 SIMS 研究了大豆根系、葡萄籽、动物组织及细胞等样品中金属组的分布[27, 28]。利用这种局部破坏性特点，可以通过逐层扫描的方式实现微区面成分分析和深度剖析，两者结合即可完成三维微区分析。

表 2-1 对以上几种技术进行了归纳。可以看出，SR-μXRF、PIXE、LA-ICP-MS 及 SIMS 均为优异的金属组分布研究技术，它们的检测限通常在 mg/kg 水平，且分辨率在 μm 水平。虽然 TEM-EDX 及 SEM-EDX 具有更好的空间分辨率，但它们的检测限在 g/kg 水平，不适于生物样品中微量元素分布研究。与商业化的

LA-ICP-MS 及 SIMS 相比，依托于大科学装置的 SR-μXRF 及 PIXE 的机时有限，故其应用也受到了一定限制。

表 2-1　几种研究金属组分布的高能量分析技术的性能

方法	激发源	可探测元素	是否区分同位素	维数	检测限	空间分辨率	参考文献
SR-μXRF	同步辐射 X 射线	周期表中氧以后的元素	否	1～3D	～mg/kg	～μm	[29]
SR-XRF CT	同上	同上	否	3D	～mg/kg	1～2μm	[14]
EDX	X 射线管	同上	否	1D，2D	～g/kg	nm	[17]
PIXE	质子	周期表中钠以后的元素	否	1～3D	～mg/kg	4μm	[21]
LA-ICP-MS	等离子体	几乎所有元素	是	1D，2D	sub mg/kg	10μm	[17]
SIMS	离子束	同上	是	1～3D	ng/kg	10μm	[26]

2.1.3　高通量金属组的形态及结构分析方法

金属组的形态与结构分析方法的流程如图 2-1 所示。

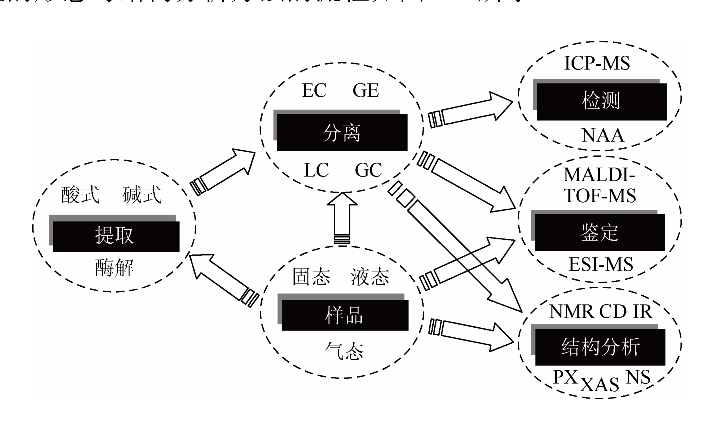


图 2-1　联用技术研究金属组的形态及结构流程图。其中，LC，液相色谱；GC，气相色谱；EC，电色谱；GE，凝胶电流；MALDI-TOF-MS，基质辅助激光解析电离飞行时间质谱；ESI-MS，电喷雾质谱；NMR，核磁共振质谱；CD，圆二色谱；IR，红外光谱；PX，蛋白质晶体学技术；XAS，X 射线吸收谱；NS，中子散射谱

从图 2-1 可看出，金属组形态及结构分析通常涉及样品金属组提取（酸、碱提取，酶解），分离（GC、LC、EC 及 GE 等），检测（ICP-MS 及 NAA 等），鉴定（MALDI-TOF-MS 及 ESI-MS 等）及结构分析（PX、XAS、NS 等）。上述各步骤需要高通量分析手段才能满足金属组学研究的高通量分析要求。前面提到，ICP-MS 和 NAA 具有同时检测多种元素的能力，是高通量元素分析的有

力手段，但这些技术均不能给出物种信息，因而形态分析中需要事先提取金属组，并将各含金属物种分离。表 2-2 显示了分子活化分析技术（molecular activation analysis，MAA）研究微量元素的化学形态的例子，它综合利用前处理技术与 NAA 检测技术对生物及环境样品中的元素形态进行分析[30]。

表 2-2　MAA 方法研究微量元素的化学形态研究示例

元素	研究对象	研究目的	主要结果
稀土元素	植物叶片[31, 32]	探讨与稀土元素结合的生物大分子	发现了某些新型与稀土元素结合的多糖及 DNA
铂族元素	白垩纪-第三纪地层[33, 34]	探讨地层中异常铂族元素的来源	无论海泥还是陆地层，非酸溶相中铱富集约 50%
碘	1. 海草[35] 2. 人肝[36]	探讨碘的分布	1. 海草中一半的碘与蛋白质结合 2. 肝细胞中细胞核碘含量最高，胞液、线粒体、溶酶体及微粒体中碘含量则依次降低
铬	1. 富铬酵母[37] 2. 大鼠[38]	1. 检验铬元素是否进入酵母细胞 2. 探讨铬缺乏与糖尿病的关系	1. 铬可以通过细胞壁进入酵母细胞 2. 在患糖尿病大鼠体内，铬参与糖及脂类代谢
汞	人发[39]	探讨汞在母子间的传播	甲基汞很容易从母体转移到胎儿
硒	人肝[40, 41]	研究硒在人肝细胞的亚细胞组分中分布	1. 几乎一半的硒存在于细胞核中 2. 鉴定了 8 种含硒蛋白

1. 金属组学研究中的样品制备与前处理

生物样品形态分析时通常涉及前处理，湿法消化如酸、碱提取及酶解是最常见的方法。本步骤中的关键是保证样品中金属组的形态不能在酸、碱或酶的作用下发生变化。因为在研究样品中汞的形态时发现，前处理可导致某些无机汞转化成甲基汞[42, 43]。通过超声波或微波辅助技术，可以实现样品的批处理。

2. 金属组学研究中的形态分离与分析

样品中金属组经提取后，在进行种态分析时，首先需要进行分离，因为现有元素分析技术如 ICP-MS 或 NAA 只能检测元素，无法得到其形态信息。分离手段可包括：①基于色谱技术的分离方法，如液-固萃取中的 HPLC，固相萃取（solid-phase extraction，SPE）和固相微萃取（solid-phase microextraction，SPME），液-液萃取中的溶剂萃取，压力液相萃取（pressurized liquid extraction，PLE），以及液-气萃取中的 GC 和吹扫技术等[44]；②基于电泳技术的分离方法，如 1D、2D GE，毛细管电泳（CE），毛细管区带电泳（CZE），毛细管凝胶电泳（CGE），胶束电动毛细管（MEKC），以及毛细管阵列电泳（CAE）等[45]。

基于色谱技术的分离方法通常效率较低。例如，无论是 HPLC 还是 GC，都只

能单次进样，而多个 SPE 柱的同时应用使得批量分离成为可能。柱切换（column-switching）技术是另一种可提高分离效率的方法，其主要优点有：

（1）前处理简单，自动化操作。样品只需简单处理即可将血浆乃至全血直接进样测定。

（2）富集被测组分，提高了分析灵敏度。尤其是水溶性较大的组分，无法用液-液萃取时，HPLC 柱切换技术特别奏效。

（3）不需用内标物。由于进样体积较大，处理样品的全过程由仪器程序控制，可获得很高的精密度与重现性[46]。

基于电泳技术的分离方法已在蛋白质组学研究中获得广泛的应用。凝胶电泳技术（GE），尤其是 2D 凝胶电泳技术是分离蛋白质的有力方法，但若想分析蛋白质中的金属组，就需要利用 ICP-MS 及 NAA 等技术的配合。而 GE 难以与 ICP-MS 或 NAA 等金属组检测器进行在线联用，故难以实现自动化，仍属于低通量方法。与之相比较，毛细管电泳（CE）可以很容易与其他检测器连接，从而实现自动化操作。目前 CE 与 ICP-MS 连接可用于分析检测金属卟啉、环境样品中锑的形态、测定维生素 B_1 等[47]。

3. 金属组学研究中的形态鉴定

通常情况下，对于已知稳定的化合物，如甲基汞、有机硒、砷或锡化合物等，可通过与标准样品的保留时间比对而得以确认。生物体中硒的存在形式有中性和离子形态的无机和有机硒化合物、硒代氨基酸和各种硒蛋白。喻宏伟等[48]建立了在线分离分析生物样品中含硒化合物的联用方法，用反相离子对高效液相色谱（RP-IP-HPLC）分离含硒化合物，用电感耦合等离子体质谱（ICP-MS）在线分析硒含量，实现了对硒酸钠、亚硒酸钠、硒代胱氨酸、硒代胱胺、硒代蛋氨酸、硒代尿素和三甲基硒离子等 7 种生物体常见的含硒小分子的分析。生物样品中复杂的基体成分对硒化合物的保留值和峰形影响较小，且不影响出峰次序，各含硒化合物加标回收率在 93%～117%，定量分析结果也比较准确。此方法操作简便，灵敏度高，重现性好，适合于各种生物样品中含硒小分子的形态分析。Li 等[49]利用 HPLC-ICP-MS 研究了长期汞暴露人群补硒后尿液中汞、硒形态的变化，尿中汞主要以无机汞的形式存在，补硒后尿中硒主要以硒代胱氨酸的形式存在。但应该指出的是具有相同的保留时间并不能保证它们是同一种化合物。因此，鉴于生物样品的复杂性，在色谱图中经常可发现无法指认的色谱峰，这就需要应用分子质谱学技术，如 MALDI-TOF-MS 或 ESI-MS 来确认或确定其分子信息。MALDI-TOF-MS 通常难以与上述的分离技术在线联用，而 ESI-MS 却可以与 HPLC 等分离技术在线连接。目前，HPLC-ICP-MS 与 ESI-TOF-MS 联用已成功鉴定了富硒酵母中的多种含硒化合物[50]。在蛋白质组学中普遍使用的凝胶电泳，由于其高分辨率，结合近年快速发

展起来的微量进样系统和高灵敏度的检测器（如 LA-ICP-MS、Nano HPLC-ICP-MS 和 Cap HPLC-ICP-MS）也越来越多地应用于硒蛋白的研究，而且由于其取样微量，在对凝胶中蛋白质进行硒定量分析后，蛋白条带或斑点中余下部分还可用于 MALDI-TOF-MS 和 Nano HPLC-ESI-MS/MS 进行蛋白质的识别和测序。应该注意的是，虽然 MALDI-TOF-MS 及 ESI-MS 可用于样品形态的鉴定，但由于它们的检测限比较差，故其在金属组学中的应用也受到了一定的限制。

4. 金属组学研究中的结构分析

金属组学中的结构分析方法有基于束流的方法及核磁共振技术等。

基于束流的方法可获得原子水平的结构信息。束流可包括 X 射线、γ 射线及中子流等。

X 射线照射到样品中某元素的原子时，其内层电子吸收能量后被逐出，X 射线强度则因吸收有所衰减。当 X 射线透过厚度为 d 的样品时，其透射强度 I 与入射强度 I_0 的关系满足 $I=I_0e^{-\mu d}$，式中的 μ 是样品的总吸收系数，其大小反映了该物质吸收 X 射线的能力，同时吸收系数也是入射 X 射线波长的函数，不同元素的吸收系数-入射波长曲线在特定波长处会出现跳变，这些跳变称为该元素的吸收边，吸收边高能侧曲线有起伏振荡现象，这种振荡结构称为 X 射线吸收精细结构（XAFS），包括扩展 X 射线吸收精细结构（EXAFS）和 X 射线吸收近边结构（XANES）。EXAFS 是指吸收系数在吸收边高能侧 30～1000eV 范围出现的振荡；XANES 是指吸收边附近约 50eV 范围内的精细结构。XAFS 现象只取决于短程有序的作用，振荡结构反映了许多吸收原子周围环境的结构信息，而 X 射线吸收边具有元素特征，通过调节入射 X 射线的能量，对凝聚态和软态物质等简单或复杂体系中原子的 XAFS 进行研究，可给出吸收原子以及近邻配位原子的种类、距离、配位数和无序度因子等结构信息[51，52]。

在基于 X 射线的结构分析技术中，单晶 X 射线衍射谱是研究晶体三维结构的强有力工具，它的分辨率可达 0.15～2nm，但由于需要获得单晶，故其实际应用受到一定的限制。而 XAFS，特别是扩展 X 射线吸收精细结构（EXAFS）光谱无需晶体样品即可获得样品的局域结构信息，可以原位探测吸收原子的 2～3 个邻近配位壳层，获得目标元素的电子结构信息和化学结构信息，其空间分辨率可达 0.1～1pm[53]，所以 XAFS 已成为研究微观结构重要的手段之一。Harris 等[54]采用 EXAFS 技术研究了海鱼肌肉中汞的形态。为了减少放射性损伤，将样品置于 Oxford 恒温系统中，样品测试在 10K 条件下进行，用 30 元锗阵列探测器结合快速模拟电子学系统测定 Hg Lα1 荧光激发光谱，为避免高计数率条件下探测器的非线性问题，用 9 倍吸收长度厚的 Ga_2O_3 滤片吸收散射背景，调节垂直和水平狭缝使 Hg Lα1 荧光保持最强，用充氮电离室测定入射和透射的 XAS 强度，在测定

样品的同时，以 Sn-Hg 齐箔的 L_{III}-边谱为标准进行能量刻度。每次扫描时间 18min，将 6～8 次扫描结果平均得到 XAS 谱。结果表明：汞主要以硫化甲基汞形式存在，含硫配基可能来自半胱氨酸或蛋白质。Li 等[55, 56]利用 XAS 原位研究了长期汞暴露人群头发及血液中汞的形态，发现汞主要与硫结合，头发中汞为三配位，而血液中汞为四配位。另外，通过 XAS 还可对由单晶 X 射线衍射谱所得到的结构尤其是局域结构进行精修，从而获得更精确的结构信息[57]。

穆斯堡尔谱（Mössbauer spectroscopy）同样是一种研究局域结构的方法，它是基于 γ 射线吸收或发射的方法[58]。穆斯堡尔谱在生物样品中应用的最大局限在于可供检测的同位素较少。生物体系中，穆斯堡尔谱研究最常见的同位素是 ^{57}Fe，利用穆斯堡尔谱可以研究生物样品的铁蛋白[59]。本章后面内容将较详细地介绍穆斯堡尔谱及其在金属蛋白质组学中的应用。

采用中子作光源的技术，如单晶中子衍射（SCND）可为单晶 X 射线衍射提供有力的补充，因为它可以在 20nm 的分辨率上研究氢等轻元素原子[60]。而小角 X 射线散射（SAXS）及小角中子散射（SANS）均可以得到固态或液态生物样品的结构信息，其分辨率在 100nm 左右，同样它们均不需要获得样品的单晶[61]。

核磁共振谱（NMR）同样可以给出样品三维结构信息，其分辨率可与单晶 X 射线衍射相媲美，达到 0.15～2nm[62]。NMR 最大的优势是它可在溶液中直接测定，无需晶体形式的样品。NMR 测定晶体结构的一个问题是，即使是同一个单晶样品，NMR 可获得一系列（10～50 个）能够符合晶胞结构的信息，而单晶 X 射线衍射获得的是一个或只有几个符合条件的结构。因此，对 NMR 获得的晶体结构常需要进行再确认。

由于每次只能测定一个样品，故上面提到的这些结构表征的方法通常都是低通量研究方法，但目前已有研究者提出通过高通量 XAS（HTXAS）的研究方法研究蛋白质中的金属组。例如，Scott 等[63]用高通量技术克隆标记表达和纯化了源自 *Pyrococcus furiosus* 的大约 2200 个开读框架中的 25 个重要基因，收集到专门设计的 25 孔样品架中（样品孔直径 1.5mm，以 5×5 方式排列于 1in① 聚碳酸酯支架上），每孔装 0.2～1mmol/L 蛋白质溶液 3μL（此量远少于 X 射线衍射晶体学研究和核磁共振研究的样品用量）。在 SSRL 的 BL9-3B 束线上，用 1mm×1mm 的同步辐射光斑分析样品中金属组分布，然后根据元素分布情况用 30 元固体探测器对目标蛋白进行进一步种态分析（XANES）和结构分析（EXAFS）。利用这种方法，他们在这 25 种基因产物中检出了两个含 Ni 蛋白和一个含 Zn 蛋白。但值得指出的是，发展 HTXAS 仍存在几个瓶颈，如如何实现 XAS 微量样品自动进样，如何实现低含量、微量样品的测定与数据的自动化采

① in 为非法定单位，1in=2.54cm。

集，以及如何对大量数据的进行快速处理与分析等。

2.1.4　小结

在金属组学研究中，ICP-MS 与 NAA 技术可实现多元素同时定量分析，而 SR-μXRF、同步辐射微束荧光 CT、EDX、PIXE、SIMS 及 LA-ICP-MS 可实现金属组分布研究。金属组的形态及结构分析通常为低通量方法，但目前也已有一些方法可实现高通量形态或结构分析，如 HTXAS。

另外，生物信息学是一门数学、统计、计算机与生物医学交叉结合的新兴学科，它已广泛地渗透到医学的各个研究领域中，成为生物医学发展不可缺少的重要工具[64]。随着各种高通量金属组学技术的发展，可以获得大量数据，而处理这些海量数据将不可避免地应用到生物信息学技术。因此，生物信息学的方法将极大促进金属组学的研究，并成为金属组学的一个重要工具。

2.2　金属蛋白质组学技术及应用

金属组学与基因组学、蛋白质组学及代谢组学等学科相互交融。例如，金属组学与蛋白质组学研究形成了一门全新交叉学科，即金属蛋白质组学（metalloproteomics）。金属蛋白质组学主要研究一个蛋白质组内所有金属蛋白的结构、金属的配位环境、蛋白质功能和构效关系，从而阐述生物体内金属与蛋白质和酶等的结构信息，如三维结构及活性中心、金属离子的结合位点以及与之相关联的功能和生物效应[65]。

金属蛋白质组学研究可以使我们了解金属蛋白的生物合成过程，包括一系列翻译后过程，如金属吸收、转运、分子组装、簇交换等以及环境因素对这些过程的影响，了解微量元素的生物效应及其机理、与微量元素相关的疾病的发生机理，并为金属药物的设计提供依据，人们还希望通过金属蛋白质组学研究最终实现由一个新的基因序列预测其所表达金属蛋白的功能（功能基因组学）。借鉴蛋白质组的研究思路，我们建议并使用下面的金属蛋白质组学研究路线图（图 2-2）。

该研究方案的主要步骤包括：用全息样品制备技术从生物样品（各种生理病理条件下的器官、组织，培养的细胞）中提取蛋白质、分离蛋白质、分析各个蛋白质的微量元素组成、表征金属蛋白序列和结构等，样品中金属蛋白的种态分析和蛋白质结构的表征是至为重要的研究步骤。

分子活化分析（MAA）、质子激发 X 射线荧光分析（PIXE）、同步辐射 X 射线荧光分析（SRXRF）、LA-ICPMS、同位素稀释技术（ID）、同位素标记技术等已广泛用于生物体系中金属蛋白的种态分析研究，而同步辐射 X 射线衍射技术、同步辐射 X 射线吸收光谱、中子散射和穆斯堡尔谱（Mössbauer spectroscopy）

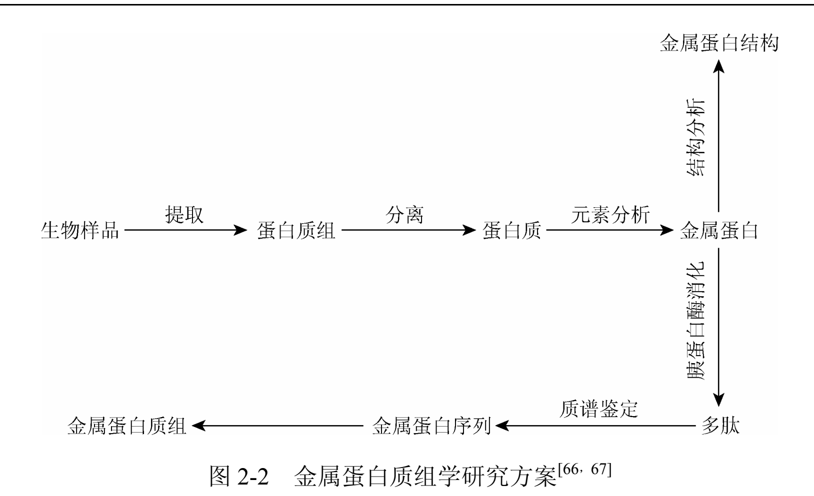


图 2-2　金属蛋白质组学研究方案[66, 67]

技术则是蛋白质结构以及金属结合位点结构分析的有力武器。

2.2.1　生物体系中金属蛋白种态研究

微量元素主要通过它们参与形成的各种各样的生物大分子来实现其生理生化功能，因而它们在生物体内的存在形态及分布直接影响其功能的发挥，生物体系中微量元素总量的分析对于研究其固有的生物学意义往往是远远不够的[68]。另外，元素的生物可利用性和毒性也取决于其化学形态，所以在生物学、医学、药学、营养学、农业及环境等学科领域都迫切需要对微量元素进行化学形态分析。因为生物体系中微量元素主要与蛋白质结合形成金属蛋白或金属酶，所以对其进行形态分析的主要内容就是研究金属蛋白种态及其含量，这也是金属蛋白质组学研究的首要内容。研究的方法一般是先将蛋白质提取并分离，然后测定各蛋白质中的金属种类和含量。因为生物样品的组成比较复杂，一个金属蛋白或亚基往往只含有一个或几个金属离子，所以研究水平高度依赖于高效、高分辨的蛋白质分离方法和高灵敏度的多元素分析方法[69]。目前，用电感耦合等离子体质谱（ICP-MS）在线检测 HPLC 分离后各组分中的微量元素含量已经成为一种方便快捷的生物样品中微量元素的化学形态分析方法，已经有文章对该联用技术在生物样品中微量元素的形态分析中的应用做了很好的综述[70, 71]。联用技术的局限表现在：ICP-MS 不能检出元素的存在形态，只能以 HPLC 分离的保留时间表征被分离物质分子，目前又缺乏合适的保留时间标准物质；高效液相色谱的分离分辨率不高，二维高效液相色谱大大提高分离分辨率，但高效液相色谱分离之间的在线连接技术还不成熟；色谱分离所用的流动相中的有机物和盐含量对后续 ICP-MS 分析有影响；原子团可以干涉元素的 m/z 信号，导致虚假的元素信息[72]。先进核分析技术与各种化学或生化分离技术结合用于生物样品中微量元素的种态

分析时可以克服或部分克服上述局限性。

1. 分子活化分析

前面提到，分子活化分析（MAA）是基于传统的中子活化分析与生物环境样品中特定元素化学种态分离技术的结合。本实验室将化学或生物化学等元素形态分离技术与具有高灵敏度的中子活化分析方法相结合，发展了用于生物样品中微量元素种态分析的 MAA 方法[30]，并在微量元素的生物效应领域做了很多工作。范例之一是用 MAA 研究了植物、实验动物以及人对稀土元素的吸收，稀土元素进入体内后的分布，以及它们与生物大分子（蛋白质、多糖、DNA）间的结合情况，为农用稀土肥料、饲料进入食物链后可能产生的生物学效应提供了依据。

Zhang 等[73，74]的研究表明：土壤中的水溶性稀土是植物根系最容易吸收的形式，根系吸收的稀土大多数结合在细胞壁组分中。作者采用 MAA 研究了 *Brassia napus* 的叶肉原生质体中稀土的亚细胞分布，证明稀土在叶绿体中蓄积，大约每 2000 个叶绿素分子结合一个稀土离子，这可能是稀土能够增强植物光合作用的原因所在[75-77]。另外，他们利用 MAA 技术发现富含稀土的蕨类植物的叶片含 2 种稀土结合蛋白、4 种稀土结合多糖和 1 种稀土结合 DNA[78，79]，2 种稀土结合蛋白的分子质量分别为 800kDa 和小于 12.4kDa，SDS-PAGE 研究结果显示它们各自含有 2 个亚基，这些亚基为具有不同糖基的糖蛋白。所有 4 种稀土结合多糖的分子质量均在 10～20kDa 范围内，叶片内与 DNA 结合的稀土不到总量的 1%。

对人体内稀土吸收、转化的研究表明，进入人和动物血液的稀土首先被肝脏吸收[80]，稀土在人和小鼠肝细胞的各亚细胞器中有相似的分布模式：微粒体中稀土浓度最高而胞质溶胶中最低[81]。静脉注射富集稳定性同位素 ^{152}Sm 和 ^{168}Yb 后，用体积排阻色谱分离小鼠肝蛋白提取物，用中子活化法检出 2 种可溶性稀土结合蛋白，分子质量分别为 68kDa 和 40kDa。相同的方法用于研究取自意外死亡的正常人肝样品，在肝细胞上清液中至少检出 3 种含镧蛋白[M_w 分别为（335±50）kDa、（94.5±15.4）kDa、（13.6±3.8）kDa]，3 种含铈蛋白[M_w 分别为（335±50）kDa、（85±12）kDa、（22.8±6.3）kDa]和 4 种含钐蛋白[M_w 分别为（335±70）kDa、（82.1±5.4）kDa、（32.3±5.8）kDa、（13.6±4.5）kDa][82]。

相对于其他种态分析方法，MAA 法具有灵敏度高，准确度好，在分析过程中可保持元素的化学种态不变，可同时提供多种元素的化学种态信息，无基体效应等优点，然而该方法也有不足之处，主要是在线和实时分析尚有困难。

2. X 射线荧光法与 LA-ICPMS 法

X 射线荧光（XRF）分析除可用于研究生物样品如组织中微量元素的微区分布外，还可以用来直接测定生物样品经电泳分离后蛋白条带中的微量元素分布情

况。利用 XRF 对经电泳分离后的蛋白质中金属的检测通常有三种方式，①扫描单条蛋白条带：由于对整条蛋白条带进行扫描，因此不需要对蛋白条带进行染色，这也避免了金属的损失；②扫描特定的蛋白点：该法要求对蛋白质染色以确定蛋白点的存在位置；③扫描整块凝胶：该法可以获得金属元素在整块凝胶上的分布情况，但该法非常耗时。

将电泳和 XRF 联合用于分析与蛋白质结合的金属始于 Stone 等[83]的工作。他们用聚丙烯酰胺电泳（PAGE）处理谷胱甘肽过氧化物酶，然后用微束 XRF 和能量色散 XRF 分析凝胶基体中蛋白条带中的硒，检出限分别达 2.1ng、30～60ng。

除经典的 X 射线管可用作激发光源外，还有用高能质子束激发被测样品从而进行荧光分析（PIXE）。PIXE 具有更高的分析灵敏度，更容易检出蛋白条带中的微量元素。Szökefalvi-Nagy 等首次用 SDS-PAGE 处理一种来源于紫色硫光合作用菌（*Thiocapsa roseopersicina*）的氢化酶（HiPIP，内含 4 个 Fe-S 原子簇），凝胶干燥后，用 3MeV 的质子束照射蛋白条带，用 XRF 技术分析条带内 Fe、Ni 的相对含量，所用蛋白质含量少于 1μg[84-86]。电泳处理后蛋白条带内金属的 PIXE 定量分析也有报道[29, 30]，用 2.5MeV 质子束激发样品，将元素的特征信号峰面积与掺有一定量金属的凝胶所产生的信号比较得出金属含量信息，用光密度扫描法确定条带蛋白含量后，可以求出条带内的金属/蛋白质含量比。

用加速器产生的同步辐射（SR）作激发光源的同步辐射 XRF 尤其值得关注。SR 光具有强度高、准直性好、能量范围宽等特点，这些特点大大提高了 XRF 分析的空间分辨率（～μm）和测定灵敏度，使其绝对检出限改进到 10^{-12}～10^{-15}g，相对检出限达到μg/g 量级，在优化条件下甚至可达 10ng/g[8]，样品量只需几微克。该技术已被成功地用于研究各种病理组织和正常组织各微区，甚至一个细胞中多种微量元素的测定，以了解疾病机理以及微量元素的生物化学行为[87, 88]。XRF 技术与电泳分离技术相结合可以组成一种新的金属蛋白种态分析联用技术。Homma-Takeda 等[89]利用等电聚焦（IEF）技术分离了与汞作用前后的Ⅱ型金属硫蛋白以及铜锌超氧化物歧化酶溶液，用 SRXRF 测定蛋白条带中的金属含量以研究汞与蛋白质的结合情况，发现汞可以与金属硫蛋白结合并使其等电点（pI）发生变化，该变化可以被谷胱甘肽阻断，说明巯基与这种等电点变化相关。虽然汞也同样和铜锌超氧化物歧化酶结合，并严重抑制酶的活性，但不引起其等电点的变化。

这些工作所研究的金属蛋白都是经过预先纯化的单一蛋白质。本实验室近年来一直致力于将 SRXRF 技术与电泳技术结合直接研究生物样品中金属蛋白的分布。电泳是目前分辨率最高的蛋白质分离技术，应用 SRXRF 的元素选择性分析模式对电泳分离后蛋白条带进行扫描测定，可以在一个测定点上测得多种元素的含量，二者结合可以满足高通量金属蛋白质组学研究的要求，该方法的示意图如

图 2-3 所示。陈春英等首先用所建立的方法原位测定了人体肝组织经 SDS-PAGE 分离后蛋白条带中微量元素，发现人肝胞液中分子质量为 29.5kDa 的蛋白质峰中金属离子以锌为主。该方法首次利用 SRXRF 技术实现人肝金属蛋白电泳分离后元素的原位测定[90]。

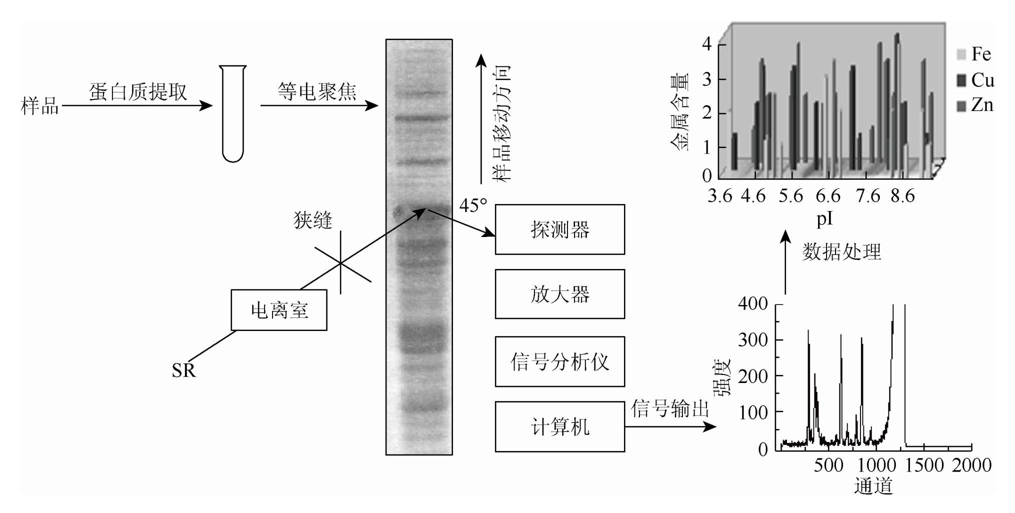


图 2-3　生物样品中微量元素种态分析的电泳-SRXRF 联用研究路线示意图[66, 67]

为避免染色脱色过程所用试剂引起的蛋白质结合金属的丢失以及样品污染，利用双垂直电泳系统同时电泳两块胶板，一块胶板的蛋白质经染色后做对照测定未染色胶板上的金属蛋白中的金属含量，得到含锌蛋白的分布信息。但来源于凝胶材料的本底信号很强，几乎观察不到其他元素的信号，限制了方法的实际应用。电泳后凝胶经干燥处理可大大降低材料本底信号，使得用该联用技术研究实际生物样品中金属蛋白的分布成为可能。利用该法可测定人肝细胞胞质溶胶经 SDS-PAGE 电泳分离后蛋白条带内铁、铜、锌等的相对含量[91, 92]。考虑到 SDS 变性处理后，蛋白质会部分失去所结合的金属离子，利用非变性的等电聚焦（IEF）分离人肝细胞蛋白，结合 SRXRF 分析，可以得到更全面详尽的金属蛋白物种分布信息[93]。为扩展方法的使用范围，用单色同步辐射对感兴趣元素进行选择性激发，进一步改善了信号质量，使我们能够研究一些对生命活动有重要影响的较重元素如硒、砷、汞等的体内结合状态。Gao 等[94, 95]用所提出的方法研究人肝细胞癌及其癌旁组织细胞胞质溶胶内含铁、铜、锌等金属蛋白，发现在肝细胞癌组织以及癌旁组织的微粒体中共检出 7 个含锰蛋白条带、8 个含铁蛋白条带、6 个含铜蛋白条带和 8 个含锌蛋白条带。癌组织和癌旁组织微粒体的相应蛋白条带内的金属含量相近，但在癌组织的等电点（pI）为 5.9 的含铁条带中铁含量仅为癌旁组织相应条带的 40%，在 pI 为 9.3 的条带中铜、锌的含量分别是癌旁组织的 2

倍和 3.5 倍。由此可见，癌组织和癌旁组织的金属蛋白分布模式明显不同，金属蛋白分布的区别可能与肝组织的癌变相关。

用电泳技术结合 SRXRF 构成了一种准在线联用技术，可以研究生物样品中金属蛋白的物种分布，该方法的优势在于电泳分离的分辨率较高，如等电聚焦可以区分等电点差别为 0.001 个 pH 单位的两种蛋白质，新发展的双向电泳技术可以区分出生物样品中数千个蛋白质斑点[96, 97]。该方法在提供微量元素组成信息的同时，还可提供蛋白质含量、特性等电泳数据；分析过程不破坏样品，有利于对感兴趣的金属蛋白进行进一步的研究。这对其他联用技术如 HPLC-ICP-MS 是比较困难的。由于 X 荧光的多元素分析特性，该技术还可以用于研究生物体系中微量元素之间的协同和拮抗作用。

上述方法主要利用 SRXRF 对蛋白条带中的金属离子进行定性分析。高愈希等[98]探索了金属蛋白中的金属定量测定问题，通过选取已知锌含量的牛血清白蛋白作为标准蛋白，经 IEF 处理后用 SRXRF 测定条带的锌信号强度，以此做工作曲线对人肝细胞胞质溶胶经 IEF 分离后蛋白条带内锌做定量分析。为解决光斑不能覆盖蛋白条带的问题，在计数时间内沿条带方向均匀移动光斑，实现其对条带的相对均匀覆盖。因为牛血清白蛋白经等电聚焦分离后可分成若干条带，所以用它做工作曲线耗时费力。为此用组成与 IEF 胶相同的浓缩胶电泳，将牛血清白蛋白电泳成单一条带，以此定量标准做工作曲线，对人血红蛋白等电聚焦分离后各亚型条带内的铁含量做了定量分析[99]。因为电泳制备定量标准有蛋白条带的拖尾现象，而且电泳过程本身可能使蛋白质上靠弱作用吸附的金属离子丢失，这些会对分析结果产生影响，为此通过制作均匀掺入一定量金属离子和不含微量元素的蛋白质的凝胶作为 SRXRF 测定蛋白条带内金属含量的定量标准，做工作曲线对人血红蛋白等电聚焦分离后各亚型条带内的铁含量做定量分析。该法测定对 Fe、Cu、Zn 检出限分别为 2.43μg/g、1.12μg/g 和 0.96μg/g；测定蛋白条带内 Fe 和 Zn 的回收率分别为 90.4%和 115.7%。该联用技术可用于生物样品中微量元素的化学形态分析，同时可给出蛋白质的微量元素组成和等电点等信息[100]。Zhao 等[101]利用该法对富硒酵母中含硒蛋白进行了定量分析，总计发现了 157 种含硒蛋白，所有含硒蛋白的总硒含量为 125.56μg/g。

基于同步辐射装置的 SRXRF 的机时非常紧张，人们通常更多用 LA-ICPMS 替代 SRXRF 技术进行金属蛋白质组学研究。Nielsen 等[102]开创了该研究方向，他们利用该法研究了人血清白蛋白与钴（Co）结合的情况，发现 Co 主要与血清白蛋白、α2-巨球蛋白、α1-脂蛋白、β1-脂蛋白、α2-抗胰蛋白酶及结合珠蛋白等蛋白质结合。

利用电泳技术结合 SRXRF 或 LA-ICPMS 进行金属蛋白质组学研究最大的难点是保证与蛋白质结合的金属离子不会在样品处理过程中脱落或被其他杂质离子取代，因此需要采取非蛋白变性分离技术，避免凝胶中有其他杂质离子，还要保

证染色液中没有杂质离子[103]。

3. 同位素示踪法

在生命科学领域，同位素示踪法多用于外源性物质在生物体内的吸收代谢等过程的研究，也可用于研究生物样品中金属蛋白的分布。Behne 等用放射性同位素示踪法研究了大鼠体内含硒蛋白的分布，给硒极度缺乏的大鼠饲以含放射性 ^{75}Se 的饲料一段时间后，用 SDS-凝胶电泳法分离大鼠各种组织的匀浆液，通过放射自显影将硒在各蛋白条带内的分布情况显示出来。研究发现大鼠体内共有多达 28 种含硒蛋白或其亚基[104, 105]，并由此从大鼠前列腺上皮细胞中分离到一种含硒代半胱氨酸的蛋白质，即前列腺上皮细胞硒蛋白（PES）。它大约结合前列腺上皮细胞中 2/3 的 ^{75}Se，该方法的检出限可达 10^{-15}g[106]。Feng 等[107]给 Wistar 鼠静脉注射 ^{50}Cr，用体积排阻色谱分离鼠肝各亚细胞组分的蛋白质提取液，用中子活化法测定了各色谱峰中的 ^{50}Cr 含量，结果共检出 9 种含 Cr 蛋白，分子质量分别为[（96.6±6.2）kDa、（68.2±1.4）kDa、（57.9±4.7）kDa、（36.6±1.2）kDa、（24.2±1.8）kDa、（14.0±1.5）kDa、（8.8±0.6）kDa、（6.9±0.4）kDa、（4.2±0.4）kDa]。约 64.5%的 Cr 蛋白存在于细胞胞质溶胶，12.2%含 Cr 蛋白存在于细胞核，在线粒体中 56%的含 Cr 蛋白分子质量小于或等于 6.9kDa，而在细胞胞质溶胶中 69%以上的含 Cr 蛋白分子质量大于等于 57.9kDa。van Hulle 等[108]给 Wistar 鼠腹腔注射[^{114m}In]$InCl_3$，然后研究了血液和其他脏器中 ^{114m}In 的分布，用体积排阻液相色谱分离蛋白质，发现在肝肾脾细胞胞质溶胶中，In 主要与高分子质量蛋白质结合。仅在肾细胞胞质溶胶中，少量 In 与低分子质量蛋白质结合，血液中 In 只结合于转铁蛋白，而 ^{114m}In 与血清体外温育后，In 除与转铁蛋白结合外还与血清白蛋白结合[109]。实验表明，In 对红细胞和肾脏组织中 ALAD 酶的抑制不是因为它们间的直接结合所致。需要指出的是：放射性同位素示踪法不能用于人体内金属蛋白分布的研究，而且微量元素在体内的分布与其体内水平有关，用这样的方法得到的微量元素种态分布信息可能与正常生理条件下分布情形有一定差别[110]。

同位素示踪法在金属蛋白质组学研究中的另一个应用是用同位素稀释质谱（IDMS）法结合高分辨分离技术（如 HPLC）进行生物样品中微量元素的种态分析研究。IDMS 被公认为是微量、痕量和超痕量成分的准确测量技术，该方法的基础是同位素丰度比的准确测量。在待测样品中定量加入待测元素的同位素稀释剂，同位素组分混合均匀后，用质谱法准确测定该元素的同位素丰度比，然后据此计算样品中待测元素的含量，这样将化学成分分析转化为同位素丰度的质谱测量。利用现代质谱技术很容易实现对同位素丰度比的高准确和高精确的测定，不需要标准加入或做工作曲线等步骤。在分析过程中，一旦样品和所加的同位素稀释剂混合达平衡，其他实验步骤如浓缩、稀释、分离等所造成的样品损失不会对

分析结果造成影响，此外仪器的不稳定性、信号的漂移以及基体效应对分析结果也没有影响，所以 IDMS 具有绝对测量性质、灵敏度高、方法准确、测量的动态范围宽、样品制备不需要严格定量分离等优点。

IDMS 用于元素种态分析时需要预先对样品中的各物种进行分离，一般采用色谱分离方法，这样可以实现与 IDMS 在线联用。根据加入同位素示踪剂的形式和步骤可分为特异示踪模式和非特异示踪模式[56]，前者所加入的同位素稀释剂与样品中的待测物质相同，它们的色谱行为相同，因而可在分析过程开始前加入同位素稀释剂。该法要求所分析的物种的组成和结构已知以便于合成或购买相应的富集稳定同位素示踪剂，如果需要分析同一元素的几个不同种态，则可以通过用该元素的不同同位素合成不同的示踪剂，这样就可以避免不同物种间相互转化带来的分析误差。

在非特异示踪模式中，同位素稀释剂的化学形态可以和被分析物种不同，只能在将样品中的各组分分离以后加入示踪剂，所以该模式也称柱后加入法。柱后加入法要求在加入示踪剂以前没有被分析物质的损失，在随后的质谱分析离子化前被分析物种和加入的同位素示踪剂混合完全。该模式适用于被分析物种的组成和结构不清楚或者缺乏与待测物质相应的同位素稀释剂情况下的种态分析。显然该方法只能在待测元素的离子化效率与其存在状态无关的条件下使用，事实上可以认为只有 ICP-MS 离子源的离子化效率与元素的存在形态基本无关[111]，因此，到目前为止，只有 ICP-MS 被用来进行柱后同位素稀释的质谱测定。需要强调的是，当使用超声喷雾膜去溶剂化进样技术或基体浓度较高时，同一元素的不同物种的质谱响应效果还是有区别的[112]。

使用柱后同位素加入法进行微量元素的种态分析时，在样品制备过程中的各种操作如浓缩、稀释、衍生化、萃取过程中的物质损失将导致分析结果的误差，但仪器信号漂移和基体效应对分析结果一般没有影响，这就使我们能够在 HPLC 分离过程中使用有机流动相，并能够分析一些基体复杂的样品如血清、尿液等。柱后同位素加入法的另一个优点是：在用 HPLC-ICP-IDMS 进行元素的种态分析的同时，还可用 ICP-IDMS 测定样品中该元素的总量，由两种结果之间的比较判断种态分析结果的可靠性。而且由于各物种分离后才加入同位素稀释剂，这就避免了因不同物种间的同位素交换引起的测定误差。当然柱后同位素稀释法最大的优点是它能够对未知物种进行分析，这使得它成为金属蛋白质组学研究中有实际使用价值的种态分析方法。Wang 等[113]首次在四极杆 ICP-MS 上利用柱后同位素稀释法实现了含硫蛋白混合物的在线分离和定量分析，为定量蛋白质组学研究提供了一种新的方法，而 Shi 等[114]建立了柱后（post-column）反同位素稀释法（reverse isotope dilution，RID）对示踪动物组织胞液中汞结合蛋白的含量进行定量的方法，该方法可以克服生物样品微量元素化合物分析中灵敏度低和标准蛋白不足的缺

点，有利于对生物体内低丰度金属结合蛋白进行分离和定量分析研究。Sariego Muniz 等[115]首先用柱后同位素稀释法分析了人血清中微量元素的种态。他们首先用阴离子交换色谱分离人血清样品，然后在色谱柱之后将含 ^{57}Fe、^{65}Cu 和 ^{67}Zn 同位素稀释剂持续泵入并使之混合均匀，控制适当的质量分辨率（$m/\Delta m$=3000），双聚焦 ICP-MS 可以避免血清中的原子团干扰，检出整个色谱分离过程中的 $^{56}Fe/^{57}Fe$、$^{63}Cu/^{65}Cu$ 和 $^{64}Zn/^{67}Zn$。用该法可以检出尿毒症患者和健康志愿者血清中的三组主要蛋白质（免疫球蛋白、转铁蛋白、白蛋白），两组样品的含铁蛋白分布表现出明显差异，正常人铁结合于转铁蛋白和白蛋白，而尿毒症患者的白蛋白结合铁消失。这个工作证明：柱后同位素稀释法对金属蛋白进行定量分析可以用作合适的诊断手段。到目前为止，用柱后同位素稀释法所做的金属蛋白质组学研究工作列于表 2-3。

表 2-3　用柱后同位素稀释研究生物样品中金属蛋白分布

样品	元素	方法*	富集同位素	文献
人脑细胞胞质溶胶	S，Cu，Zn，Cd	CE-ICP-SFMS	^{34}S，^{65}Cu，^{68}Zn，^{116}Cd	[116]
兔肝	S，Cu，Zn，Cd	CE-ICP-SFMS	^{33}S，^{65}Cu，^{70}Zn，^{106}Cd	[117]
鼠肝	S，Cu，Zn，Cd	CE-ICP-SFMS	^{33}S，^{65}Cu，^{70}Zn，^{106}Cd	[118]
兔肝	Cd	RP-HPLC-ICP-MS	^{111}Cd	[119]
鲤鱼肾、肝胞质溶胶	Cu，Zn，Cd	SE-HPLC-ICP-TOFMS	^{65}Cu，^{67}Zn，^{106}Cd	[120]
鳗鱼肝胞质溶胶	Cu，Zn，Cd	AE-FPLC-ICP-MS	^{65}Cu，^{67}Zn，^{111}Cd	[121]
人血清	Fe，Cu，Zn	AE-ICP-MS	^{57}Fe，^{65}Cu，^{67}Zn	[115]
人血清	Se	AC-ICP-IDMS	^{77}Se	[122]
酵母、小麦粉	Se	AE-ICP-IDMS	^{77}Se	[123]
鳕肌肉	Se	ICP-IDMS	^{77}Se	[124]
豆科植物种子	Hg	SS-ETV-ICP-IDMS	^{200}Hg	[125]
欧鲫胞质溶胶	Cu，Zn，Cd	AE-HPLC-ICP-TOFMS	^{65}Cu，^{67}Zn，^{106}Cd	[126]

＊CE：毛细管电泳；ICP-SFMS：电感耦合等离子体扇形场质谱；RP-HPLC：反相高效液相色谱；SE：体积排阻色谱；AE-FPLC：阴离子交换色谱快速蛋白液相色谱；AC：亲和色谱；TOFMS：飞行时间质谱；SS-ETV：固体进样电热蒸发；ID：同位素稀释法。

金属同位素标记技术还可用于生物样品内特定蛋白的定性和定量分析[127]。例如，然后利用金属元素标记一个或一组特定蛋白，通过检出金属元素而对这些蛋白质进行定性定量分析。Baranov 等[128]开创了这一研究方向，他们用金标记抗体，与所研究的蛋白质作用后，通过 ICP-MS 测定金含量，从而对蛋白质进行定量研究。Kinoshita 等[129]发展了专一结合于蛋白质磷酸化位点的双核 Zn（II）配合物[73]，可标记磷酸化蛋白质，然后用 MALDI-TOF-MS 进行快速专一

分析，考虑到实验过程中锌容易被沾污，其他金属同位素标记的类似技术可能会在不久的将来有较快的发展。此外，定量蛋白质组学研究中，基于质谱技术的各种同位素标签（主要是含 H、N、O、C 同位素的标记分子）技术正日益发展成为主流技术[130-132]，目前还未见到同位素标签技术应用于金属蛋白质组学的研究报道。

2.2.2　金属蛋白质组学结构表征

表征蛋白质结构是研究蛋白质构效关系的基础，传统的蛋白质结构研究建立在蛋白质晶体学（PX）和核磁共振（NMR）技术基础上，为了研究金属蛋白的功能以及环境因素对金属蛋白功能的影响，必须掌握金属活性部位的局域结构细节，这就需要详尽的具有与化学性质相称的分辨率的金属位点结构数据。能提供金属位点结构信息的实验方法主要是电子顺磁共振（EPR）、X 射线吸收光谱（XAS）和穆斯堡尔谱。EPR 只能用于测定顺磁离子，而一些金属离子没有 EPR 信号，这里我们只讨论穆斯堡尔谱和 XAS 两种核技术在金属局域结构测定方面的应用。对用于研究蛋白质空间结构的 X 射线晶体学、核磁共振、中子散射技术，研究蛋白质折叠情况的小角衍射技术等，由于篇幅有限，请参见相关文献[133]。

1. 穆斯堡尔谱

晶格束缚中的原子核发射和吸收 γ 光子时，原子核本身不受反冲的影响，这种原子核无反冲发射和共振吸收 γ 射线的现象称为穆斯堡尔效应。经吸收后所测得的 γ 光子数随入射 γ 光子能量的变化关系图称为穆斯堡尔谱。穆斯堡尔效应涉及固体中核激发态和基态能级间的共振跃迁，因此核的能级结构决定了谱形状及诸参量。而核能级又与原子核的周围环境，如核外电子配置、晶场分布等情况有关。穆斯堡尔谱线宽与核激发态平均寿命所决定的自然线宽在同一数量级，远远小于原子核-核外环境间超精细相互作用引起的核能级的移动和分裂，因而穆斯堡尔谱具有极高的能量分辨率，可十分有效地鉴别各种物质内不同的超精细相互作用，灵敏地反映出原子核的周围环境，用于金属蛋白结构研究时可以提供金属结合位点的局域结构信息。

需要指出的是：目前发现的具有穆斯堡尔效应的化学元素（不包括铀后元素）只有 42 种，在总共 80 多种同位素的 100 多个核跃迁中，大多数只有在低温下才能观察到明显的穆斯堡尔效应，室温下仅 ^{57}Fe 的 14.4keV 和 ^{119}Sn 的 23.87keV 核跃迁有较大的穆斯堡尔效应概率，所以在金属蛋白结构研究领域，穆斯堡尔谱学方法大多用来研究正常和病理条件下含铁生物大分子、模型化合物以及药物中铁的电子结构，在病理过程和环境因素作用条件下含铁生物大分子的定性、定量变化，为我们从分子水平进一步理解相关疾病的发生发展过程提供信息[78-82]。穆斯

堡尔谱应用于含铁蛋白结构研究方面的工作可参阅综述文章[83]。

近来，^{57}Fe 穆斯堡尔谱在生物化学领域中的应用也有新的发展[84]，其一是与快速冷冻淬灭法联合使用研究生物化学反应过程中铁局域结构的变化，该技术可以捕捉反应的活性中间体并对其中铁的局域结构细节进行穆斯堡尔谱学表征，以了解含铁酶的反应机理，使用该法研究了非血红素二铁酶（non-heme diiron enzymes）和 α-酮戊二酸双加氧酶的氧激活作用。其二是使用密度泛函理论计算穆斯堡尔参数，将实验测得的 α-酮戊二酸双加氧酶的穆斯堡尔参数与由模式系统计算给出的结果对照，用来推测反应中间体的结构。此外，在实验技术方面，随着先进放射性核束技术的发展，可逐渐突破放射性核素半衰期的限制，使用短寿命放射性核素进行在线穆斯堡尔测量的实验技术得以发展起来。通过核反应生成的穆斯堡尔核，以扩散、离子诱导等方法将其引入离子源，电离后通过加速器加速，再经同位素分离器分离后注入样品中，测量其穆斯堡尔谱以探测穆斯堡尔核素所在位置的微观环境信息。这种技术在金属蛋白结构测定领域的应用有待开拓。

穆斯堡尔谱方法的优点在于分辨率高，灵敏度高，抗干扰能力强，对试样无破坏，设备和测量简单，可同时提供金属活性位点的多种物理和化学信息，试样可以是晶态，也可以是粉末、超细小颗粒，甚至是冷冻的溶液。不要求对蛋白质样品进行特别的纯化和结晶处理。其局限性首先表现在只有有限数量的核有穆斯堡尔效应，且许多还必须在低温以及外加磁场下进行，这使它在应用上受到限制。此外，测定生物样品时常遇到的困难是生物大分子中铁的含量低，且 ^{57}Fe 的天然丰度只有 2.17%，所以需要的样品量较大，利用富集稳定性同位素 ^{57}Fe 可以大幅度提高样品的共振吸收截面。

2. X 射线吸收光谱（XAS）

XAS 也可用来研究金属蛋白中金属结合位点局域结构，它测得的金属中心结构的精确度和准确度可以和小分子晶体结构数据相比，优于大多数用 X 射线衍射得到的蛋白质晶体结构数据[134]。到目前为止，蛋白质数据库收录的大多数蛋白质晶体结构数据分辨率在 1.5～3.0Å 范围内，如仅有 2.9%的 Cu 蛋白的结构解析分辨率高于 1.2Å，具有很高分辨率的研究很少，主要原因是：①多数蛋白质晶体对 X 射线的衍射能力有限；②在数据采集过程中蛋白质会发生光致还原和辐射损伤；③样品一般存在微观不均一性。XAS 技术可以克服这些局限，提供亚原子分辨的金属局部环境信息，而金属活性位点信息与金属蛋白功能一般具有高度的关联性，这对研究蛋白质构效关系是非常有利的。XAS 和蛋白质晶体学技术协同使用，可以获得相当满意的金属蛋白结构信息。Corbett 等[135]用 XAS 方法测定了离体的 MoFe 蛋白和 ADP.AlF（MoFe 蛋白和 Fe 蛋白的稳定复合体）中固氮酶 FeMo 辅

因子的金属局部结构。二者中 Mo 的局域结构没有明显不同，高质量的 Mo K-和 L-边 XANES 数据为研究固氮酶循环中的其他中间状态提供了基础，用偏振单晶 XAS 方法还可研究 FeMo 辅因子的其他状态。初步研究表明该技术完全可以为晶体衍射技术尚无法探明的 FeMo 辅因子中心补充结构细节。还有一些其他研究组也在 PX 与 XAS 技术相互补充方面做了很好的工作[136, 137]。为了实现实验设备的相互补充，已经出现了一些建立在同一束线上的 PX 和 BioXAS 组合设备技术，如 Daresbury 实验室的 10 极扭摆器（MPW10）束线[135]和 SSRL 的扭摆器 BL9-3 束线等[138]。

考虑到蛋白质组中金属活性位点是普遍存在的，只有拥有这些活性位点的结构细节才能研究生长条件和发育状态等对金属插入、簇组装、金属蛋白表达等过程的影响情况，最终实现由基因序列预测所表达金属蛋白的功能（功能基因组学）。要实现对所有蛋白质金属位点结构细节的了解，必须有高通量结构表征技术，如图 2-4 所示。

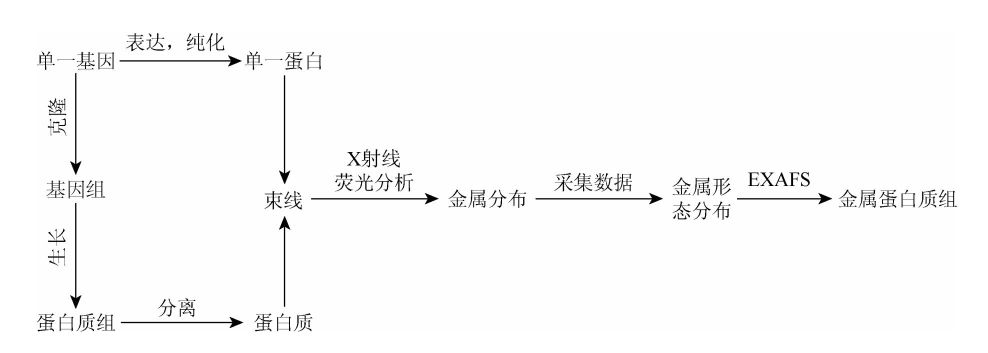


图 2-4　基于高通量 XAS 技术的金属蛋白质组学研究流程

图 2-4 中的研究方案的主要步骤包括：①在基因数据库中识别、选择编码金属蛋白的基因；②表达单一的金属蛋白；③纯化金属蛋白；④表征金属蛋白的结构特别是金属结合位点的局域结构。下面路径的不同之处在于在宿主体内先表达蛋白质组，然后分离蛋白质，再通过元素分析检出金属蛋白。目前还没有识别基因库中金属蛋白对应基因的有效方法，在异源性宿主内大量表达金属蛋白也有困难[139-141]。因为蛋白质的正确折叠要求宿主体内存在特定的金属和辅因子，这是该研究方案遇到的一个挑战。

用各种生化和分子生物学手段表达、分离、纯化得到单一蛋白后，用标准蛋白质组学技术（如质谱）进行蛋白质序列表征的同时，用 XRF 定性定量分析其微量元素组成，得到蛋白质组中的金属分布，用 XANES 法分析金属的氧化态，最后完整的 EXAFS 提供金属蛋白质组中金属位点的结构信息。

用不同的途径表达蛋白可以解决不同的生物学问题。上面的研究路线通过纯化标签、异源表达、亲和提纯、克隆单一基因产物，这个过程易于实现高通量研究必需的自动化操作。虽然得不到蛋白质相对表达水平以及翻译后修饰等生物学信息，但可以通过这个途径实现对蛋白质金属位点结构的测定，建立金属结合序列基元数据库。因为金属在很多生物学过程中有重要作用，构建这样的数据库对功能基因组学研究是非常必要的。利用下面的方案可以得到更多的金属生物学信息，在体内表达的全套蛋白质中找到的金属位点会保留生物学关联性，这些金属位点的合成包括一系列翻译后过程，如金属吸收、转运、分子组装、簇交换等，任何步骤都可能受到环境因素的影响。这些基于金属的翻译后事件是标准的蛋白质组学方法无法探测的，也是金属蛋白质组学独有的研究内容：一定环境条件下什么金属结合到哪个蛋白质；与必需金属元素的缺失、一定的毒性金属元素水平存在相对应的生物学效应等。

一些制约高通量 XAS 研究的因素是需要加以注意的。对图 2-4 中下面的流程而言，要使每种蛋白质的表达量都满足后续分析步骤的要求是困难的，还必须具备有效的分离手段。在 XAS 测试阶段还应当实现数据的快速采集、快速的数据分析和结构重建。过去两年在数据分析和自动化方面已经有了很大发展，已经提出了从 XANES 图谱提取结构信息的新方法，成功地用 MXAN 程序对不同的 XANES 谱进行了拟合，获得了满意的结果[142]。Rehr 等[143]提出用 Bayes-Turchin 法代替传统的最小二乘法拟合，这个方法利用 *a priori* 估计模型参数，有可能成为一个 XAS 的自动分析工具。

2.3　结论与展望

金属组学与金属蛋白质组学研究方兴未艾，各种技术路线、研究方法正在不断地改进和完善，多种核分析技术联合使用是很有潜力的蛋白质组学研究方法，特别是中子科学的发展将为蛋白质组学研究提供强有力的技术支持。中子因其电中性、合适的波长范围（10^0～10^3Å）及与物质中各种动态能量相近的能量范围等特性，已成为研究生物活性分子微观结构和动态过程的理想工具。将中子散射技术和本章提及的同步辐射技术结合可以对金属蛋白质的分布、结构、金属的配位环境、构效关系等展开广泛而深入的研究。上海光源、中国散裂中子源、中国先进研究堆等一批大科学装置的建设为我国金属组学与金属蛋白质组学的发展提供了新的机遇。

（赵甲亭　李玉锋　高愈希）

参考文献

[1] 李玉锋，高愈希，陈春英，等. 金属组学：高通量分析技术进展与展望. 中国科学：化学，2009，39（7）：580-589.

[2] Thompson M，Walsh J N. Handbook of Inductively Coupled Plasma Spectrometry. Glasgow：Blackie，1983.

[3] Durrant S F，Ward N I. Laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry（LA-ICP-MS）for the multielemental analysis of biological materials：A feasibility study. Food Chem，1994，49（3）：317-323.

[4] 中国科学院高能物理研究所. 中子活化分析在环境学、生物学和地学中的应用. 北京：原子能出版社，1992.

[5] Koeman J H，Peeters W H M，Koudstaal-Hol C H M，et al. Mercury-selenium correlations in marine mammals. Nature，1973，245（5425）：385-386.

[6] Jenkins R. X-ray Fluorescence Spectrometry. New York：Wiley，1999.

[7] Johansson E. PIXE：A novel technique for elemental analysis. Endeavour，1989，13（2）：48-53.

[8] van Langevelde F，Vis R D. Trace element determinations using a 15-keV synchrotron x-ray microprobe. Anal Chem，1991，63（20）：2253-2259.

[9] Karanatsios J，Freiburg C，Reichert W，et al. Quantitative multi-element analysis of denitration ceramics by X-ray fluorescence spectrometry. J Anal At Spectrom，1988，3（7）：979-983.

[10] Carmona A，Cloetens P，Devès G，et al. Nano-imaging of trace metals by synchrotron X-ray fluorescence into dopaminergic single cells and neurite-like processes. J Anal At Spectrom，2008，23：1083-1088.

[11] Gao Y，Liu N，Chen C，et al. Mapping technique for biodistribution of elements in a model organism，Caenorhabditis elegans，after exposure to copper nanoparticles with microbeam synchrotron radiation X-ray fluorescence. J Anal At Spectrom，2008，23：1121-1124.

[12] He X，Feng L，Xiao H，et al. Unambiguous effects of lanthanum? Toxicol Lett，2007，170（1）：94-96.

[13] Vincze L，Vekemans B，Brenker F E，et al. Three-dimensional trace element analysis by confocal X-ray microfluorescence imaging. Anal Chem，2004，76（22）：6786-6791.

[14] Hansel C M，La Force M J，Fendorf S，et al. Spatial and temporal association of As and Fe species on aquatic plant roots. Environ Sci Technol，2002，36（9）：1988-1994.

[15] Kametani K，Nagata T. Quantitative elemental analysis on aluminum accumulation by HVTEM-EDX in liver tissues of mice orally administered with aluminum chloride. Med Mol Morphol，2006，39（2）：97-105.

[16] Jiang J，Sato S. Detection of calcium and aluminum in pyramidal neurons in the gerbil hippocampal CA1 region following repeated brief cerebral ischemia：X-ray microanalysis. Med Electron Microsc，1999，32（3）：161-166.

[17] Motelica-Heino M，Le Coustumer P，Thomassin J H，et al. Macro and microchemistry of trace metals in vitrified domestic wastes by laser ablation ICP-MS and scanning electron microprobe X-ray energy dispersive spectroscopy. Talanta，1998，46（3）：407-422.

[18] Tylko G，Mesjasz-Przybylowicz J，Przybylowicz W J. In-vacuum micro-PIXE analysis of biological specimens in frozen-hydrated state. Nucl Instrum Methods Phys Res B，2007，260（1）：141-148.

[19] Kramer U，Grime G W，Smith J A C，et al. Micro-PIXE as a technique for studying nickel localization in leaves of the hyperaccumulator plant Alyssum lesbiacum. Nucl Instrum Methods Phys Res B，1997，130（1）：346-350.

[20] Sie S H，Thresher R E. Micro-PIXE analysis of fish otoliths：Methodology and evaluation of first results for stock discrimination. Int J PIXE，1992，2（3）：357-379.

[21] Ishii K，Matsuyama S，Watanabe Y，et al. 3D-imaging using micro-PIXE. Nucl Instrum Methods Phys Res A，

2007，571（1-2）：64-68.

[22] Meurer W P，Claeson D T. Evolution of crystallizing interstitial liquid in an arc-related cumulate determined by LA ICP-MS Mapping of a large amphibole oikocryst. J Petrol，2002，43（4）：607-629.

[23] Devos W，Senn-Luder M，Moor C，et al. Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry（LA-ICP-MS）for spatially resolved trace analysis of early-medieval archaeological iron finds. Fresenius' J Anal Chem，2000，366（8）：873-880.

[24] Becker J S，Zoriy M，Przybylski M，et al. High resolution mass spectrometric brain proteomics by MALDI-FTICR-MS combined with determination of P，S，Cu，Zn and Fe by LA-ICP-MS. Int J Mass Spectrom，2007，261（1）：68-73.

[25] Kang D，Amarasiriwardena D，Goodman A. Application of laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry（LA-ICP-MS）to investigate trace metal spatial distributions in human tooth enamel and dentine growth layers and pulp. Anal Bioanal Chem，2004，378（6）：1608-1615.

[26] Briggs B Y D，Brown A，Vickerman J C. Handbook of static secondary ion mass spectrometry（SIMS）. Anal Chem，1988，60：1791-1799.

[27] Lazof D B，Goldsmith J G，Rufty T W，et al. Rapid uptake of aluminum into cells of intact soybean root tips（a microanalytical study using secondary ion mass spectrometry）. Plant Physiol，1994，106（3）：1107-1114.

[28] Chandra S，Morrison G H. Sample preparation of animal tissues and cell cultures for secondary ion mass spectrometry（SIMS）microscopy. Biol Cell，1992，74（1）：31-42.

[29] Iida A. X-ray spectrometric applications of a synchrotron X-ray microbeam. X-Ray Spectrom，1997，26（6）：359-363.

[30] Chai Z，Mao X，Hu Z，et al. Overview of the methodology of nuclear analytical techniques for speciation studies of trace elements in the biological and environmental sciences. Anal Bioanal Chem，2002，372（3）：407-411.

[31] Wang Y Q，Sun J X，Guo F Q，et al. Study on binding of REEs with water-soluble polysaccharides in fern. Biol Trace Elem Res，1999，71（1）：103-108.

[32] Wang Y Q，Sun J X，Chen H M，et al. Determination of the contents and distribution characteristics of REE in natural plants by NAA. J Radioanal Nucl Chem，1997，219（1）：99-103.

[33] Chai C，Kong P，Mao X，et al. Molecular activation analysis for iridium. J Radioanal Nucl Chem，1995，192（1）：101-108.

[34] Kong P，Chai C，Mao X，et al. Chemical species of iridium and other trace elements in the Cretaceous-Tertiary boundary clays and their implication. J Radioanal Nucl Chem，1991，151（1）：201-211.

[35] Hou X，Dahlgaard H，Rietz B，et al. Determination of chemical species of iodine in seawater by radiochemical neutron activation analysis combined with ion-exchange preseparation. Anal Chem，1999，71（14）：2745-2750.

[36] Hou X L，Fogh C L，Kucera J，et al. Iodine-129 and caesium-137 in chernobyl contaminated soil and their chemical fractionation. Sci Total Environ，2003，308（1-3）：97-109.

[37] Ding W，Qian Q，Hou X，et al. Determination of chromium combined with DNA，RNA and proteins in chromium-rich brewer's yeast by NAA. J Radioanal Nucl Chem，2000，244（2）：259-262.

[38] Feng W，Qian Q，Ding W，et al. Study of chromium speciation in normal and diabetic rats by activable enriched stable isotope technique. J Radioanal Nucl Chem，2000，244（2）：321-325.

[39] Feng W，Qian Q，Zhang P，et al. NAA，GC（EC）and SRXRF study of Hg species in head hair of mothers and their newborn infants. J Radioanal Nucl Chem，1995，195（1）：67-73.

[40] 陈春英，章佩群，柴之芳，等. 同步辐射 X 荧光分析法原位测定人肝金属蛋白中的微量元素. 中国科学，2000，30（2）：182-186.

[41] Chen C，Lu X，Zhang P，et al. Subcellular distribution patterns of twenty four elements in the human liver samples studied by molecular activation analysis. J Radioanal Nucl Chem，2000，244（1）：199-203.

[42] Hintelmann H，Falter R，Ilgen G，et al. Determination of artifactual formation of monomethylmercury（CH_3Hg^+）in environmental samples using stable Hg^{2+} isotopes with ICP-MS detection：Calculation of contents applying species specific isotope addition. Fresenius' J Anal Chem，1997，358（3）：363-370.

[43] Wang M，Feng W，Shi J，et al. Development of a mild mercaptoethanol extraction method for determination of mercury species in biological samples by HPLC-ICP-MS. Talanta，2007，71（5）：2034-2039.

[44] 江桂斌. 环境样品前处理技术. 北京：化学工业出版社，2004.

[45] Righetti P G. Capillary Electrophoresis in Analytical Biotechnology. Florida：CRC Press，1996.

[46] 顾云. 柱切换 HPLC 技术在生物样品测定中的应用. 天津药学，2003，3（15）：80-82.

[47] 叶美英，殷学锋. 毛细管电泳和电感耦合等离子体质谱接口技术进展. 光谱学与光谱分析，2003，23（1）：89-93.

[48] 喻宏伟，陈春英，高愈希，等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法分析生物样品中硒的化学形态. 分析化学，2006，34（6）：749-753.

[49] Li Y F，Chen C，Li B，et al. Simultaneous speciation of selenium and mercury in human urine samples from long-term mercury-exposed populations with supplementation of selenium-enriched yeast by HPLC-ICP-MS. J Anal At Spectrom，2007，22（8）：925-930.

[50] Infante H G，O’Connor G，Rayman M，et al. Simultaneous identification of selenium-containing glutathione species in selenised yeast by on-line HPLC with ICP-MS and electrospray ionisation quadrupole time of flight（QTOF）-MS/MS. J Anal At Spectrom，2006，21（11）：1256-1263.

[51] 马礼敦，杨福家. 同步辐射应用概论. 上海：复旦大学出版社，2001.

[52] 麦振洪，等. 同步辐射光源及其应用. 北京：科学出版社，2013.

[53] 王其武，刘文汉. X 射线吸收精细结构及其应用. 北京：科学出版社，1994.

[54] Harris H H，Pickering I J，George G N. The chemical form of mercury in fish. Science，2003，301（5637）：1203-1203.

[55] Li Y F，Chen C，Li B，et al. Mercury in human hair and blood samples from people living in Wanshan mercury mine area，Guizhou，China：An XAS study. J Inorg Biochem，2008，102（3）：500-506.

[56] 李玉锋，陈春英，邢丽，等. 贵州万山汞矿地区人发中汞的含量及其赋存状态的 XAFS 原位研究. 核技术，2004，27（12）：899-903.

[57] Cheung K C，Strange R W，Hasnain S S. 3D EXAFS refinement of the Cu site of structural change at the metal centre in an oxidation-reduction process：An integrated approach combining EXAFS and crystallography. Acta Crystallogr，2000，D56：697-704.

[58] Dickson D P E，Berry F J. Mössbauer Spectroscopy. New York：Cambridge University Press，1986.

[59] Upadhyay A K，Hooper A B，Hendrich M P. NO reductase activity of the tetraheme cytochrome c554 of nitrosomonas europaea. J Am Chem Soc，2006，128（13）：4330-4337.

[60] Hazemann I，Dauvergne M T，Blakeley M P，et al. High-resolution neutron protein crystallography with radically small crystal volumes：Application of perdeuteration to human aldose reductase. Acta Crystallogr D，2005，61（Pt 10）：1413-1417.

[61] Feigin L A，Svergun D I. Structure Analysis by Small-angle X-ray and Neutron Scattering. New York：Plenum Press，1987.

[62] 宋启泽. 核磁共振原理及应用. 北京：兵器工业出版社，1992.

[63] Scott R A，Shokes J E，Cosper N J，et al. Bottlenecks and roadblocks in high-throughput XAS for structural genomics. J Synchrotron Rad，2005，12（1）：19-22.

[64] Lesk A M. Introduction to Bioinformatics. New York：Oxford University Press，2002.

[65] Jakubowski N，Lobinski R，Moens L. Metallobiomolecules. The basis of life，the challenge of atomic spectroscopy. J Anal At Spectrom，2004，19（1）：1-4.

[66] Gao Y，Chen C Y，Chai Z F. Advanced nuclear analytical techniques for metalloproteomics. J Anal At Spectrom，2007，22：856-866.

[67] 高愈希，陈春英，柴之芳. 先进核分析技术在金属蛋白质组学研究中的应用. 核化学与放射化学，2008，30（1）：1-16.

[68] Chai Z F，Zhang Z Y，Feng W Y，et al. Study of chemical speciation of trace elements by molecular activation analysis and other nuclear techniques. J Anal At Spectrom，2004，19（1）：26-33.

[69] Sanz-Medel A. Trace element analytical speciation in biological systems：Importance，challenges and trends. Spectrochim Acta B，1998，53（2）：197-211.

[70] Szpunar J. Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis：Metallomics，metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. Analyst，2005，130（4）：442-465.

[71] Montes-Bayón M，DeNicola K，Caruso J. Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. J Chromatogr A，2003，1000（1-2）：457-476.

[72] Michalke B，Schramel O，Kettrup A. Capillary electrophoresis coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry（CE/ICP-MS）and to electrospray ionization mass spectrometry（CE/ESI-MS）：An approach for maximum species information in speciation of selenium. Fresenius' J Anal Chem，1999，363（5-6）：456-459.

[73] Zhang Z Y，Wang Y Q，Li F L，et al. Distribution characteristics of rare earth elements in plants from a rare earth ore area. J Radioanal Nucl Chem，2002，252（3）：461-465.

[74] Zhang Z Y，Li F L，Xu L，et al. Study of binding properties of lanthanum to wheat roots by INAA. J Radioanal Nucl Chem，2004，259（1）：47-49.

[75] Zhang Z Y，Wang Y Q，Li F L，et al. Determination of rare earth elements in chloroplasts of Brassia napus by INAA and biochemical separation techniques. J Radioanal Nucl Chem，2001，247（3）：557-560.

[76] 张智勇，王玉琦，李福亮，等. 中子活化分析测定油菜叶绿体中的微量元素. 分析化学，2001，29（4）：494-494.

[77] 张智勇，王玉琦，孙景信，等. 分子活化分析研究植物原生质体中的稀土元素. 科学通报，2000，45：502-504.

[78] 张智勇，王玉琦，孙景信，等. 稀土超量积累植物铁芒萁中稀土元素的赋存状态. 稀土，2000，21（3）：42-45.

[79] 王玉琦，孙景信，张智勇，等. 用分子活化分析研究天然植物体内稀土元素的赋存状态. 核技术，2001，23：721-726.

[80] Li F，Wang Y，Zhang Z，et al. Distribution of samarium and ytterbium in rats measured by enriched stable isotope tracer technique and INAA. J Radioanal Nucl Chem，2002，251（3）：437-441.

[81] 李福亮，王玉琦，张智勇，等. 富集稳定同位素示踪研究钐、镱在大鼠肝脏中的亚细胞分布. 北京大学学报，2001，37：278-281.

[82] Chen C，Zhang P，Chai Z. Distribution of some rare earth elements and their binding species with proteins in human liver studied by instrumental neutron activation analysis combined with biochemical techniques. Anal Chim Acta，2001，439（1）：19-27.

[83] Stone S F，Bernasconi G，Haselberger N，et al. Detection and determination of selenoproteins by nuclear techniques//Kučera J，Obrusník I，Sabbioni E. Nuclear Analytical Methods in the Life Sciences. Humana Press，1994：299-307.

[84] Szökefalvi-Nagy Z，Demeter I，Bagyinka C，et al. PIXE analysis of proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis. Nucl Instrum Meth B，1987，22（1-3）：156-158.

[85] Bagyinka C，Szokefalvi-Nagy Z，Demeter I，et al. Metal composition analysis of hydrogenase from Thiocapsa roseopersicina by proton induced X-ray emission spectroscopy. Biochem Biophys Res Commun，1989，162（1）：422-426.

[86] Szökefalvi-Nagy Z，Bagyinka C，Demeter I，et al. Location and quantification of metal ions in enzymes combining polyacrylamide gel electrophoresis and particle-induced X-ray emission. Biol Trace Elem Res，1990，26-27（1）：93-101.

[87] Geraki K，Farquharson M J，Bradley D A. Concentrations of Fe，Cu and Zn in breast tissue：A synchrotron XRF study. Phys Med Biol，2002，47：2327-2339.

[88] Geraki K，Farquharson M J，Bradley D A. X-ray fluorescence and energy dispersive x-ray diffraction for the quantification of elemental concentrations in breast tissue. Phys Med Biol，2004，49（1）：99.

[89] Homma-Takeda S，Shinyashiki M，Nakai I，et al. Direct detection of mercury-bound metalloproteins（metallothionein and Cu，Zn-superoxide dismutase）using a combination of gel electrophoresis and one dimensional synchrotron radiation X-ray fluorescence analysis. Anal Lett，1996，29（4）：601-611.

[90] 陈春英，章佩群，柴之芳，等. 同步辐射 X 荧光分析法原位测定人肝金属蛋白中的微量元素. 同步辐射装置用户科技论文集，2000，（1）：361-365.

[91] 高愈希，陈春英，赵九江，等. 一种改进的同步辐射 X 射线荧光原位分析人肝细胞胞质溶胶内金属蛋白分布的方法. 分析化学，2003，31（4）：395-398.

[92] Gao Y，Chen C，Zhang P，et al. Detection of metalloproteins in human liver cytosol by synchrotron radiation X-ray fluorescence after sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. Anal Chim Acta，2003，485（1）：131-137.

[93] Gao Y，Chen C，Chai Z，et al. Detection of metalloproteins in human liver cytosol by synchrotron radiation X-ray fluorescence combined with gel filtration chromatography and isoelectric focusing separation. Analyst，2002，127（12）：1700-1704.

[94] Gao Y，Liu Y，Chen C，et al. Combination of synchrotron radiation X-ray fluorescence with isoelectric focusing for study of metalloprotein distribution in cytosol of hepatocellular carcinoma and surrounding normal tissues. J Anal At pectrom，2005，20（5）：473-475.

[95] 董元兴，高愈希，陈春英，等. 同步辐射 X 荧光研究肝细胞癌组织和癌旁组织微粒体内的金属蛋白分布. 核技术，2006，29：641-645.

[96] Klose J，Kobalz U. Two-dimensional electrophoresis of proteins：An updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. Electrophoresis，1995，16（1）：1034-1059.

[97] Rabilloud T，Lelong C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics：A tutorial. J Proteom，2011，74（10）：1829-1841.

[98] 高愈希，丰伟悦，李柏，等. 同步辐射 X 荧光法测定电泳分离后蛋白条带内的锌. 核技术，2004，27（3）：165-168.

[99] 刘颖斌，高愈希，陈春英，等. 聚丙稀酰胺凝胶基体中蛋白条带内金属含量的同步辐射 X 荧光定量分析. 高能物理与核物理，2005，29：s61-s64.

[100] 董元兴，高愈希，陈春英，等. 用同步辐射 X-荧光定量测定电泳分离后蛋白条带内的微量元素. 分析化学，2006，34（4）：443-446.

[101] Zhao J，Pu Y，Gao Y，et al. Identification and quantification of seleno-proteins by 2-DE-SR-XRF in selenium-enriched yeasts. J Anal At Spectrom，2015，30：1408-1413.

[102] Neilsen J L，Abildtrup A，Christensen J，et al. Laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry in combination with gel electrophoresis：A new strategy for speciation of metal binding serum proteins. Spectrochim Acta B，1998，53（2）：339-345.

[103] Wittig I，Braun H P，Schagger H. Blue native PAGE. Nat Protocols，2006，1（1）：418-428.

[104] Behne D，Hilmert H，Scheid S，et al. Evidence for specific selenium target tissues and new biologically important selenoproteins. Biochim Biophys Acta，1988，966（1）：12-21.

[105] Behne D，Kyriakopoeulos A，Weiss-Nowak C，et al. Newly found selenium-containing proteins in the tissues of the rat. Biol Trace Elem Res，1996，55（1-2）：99-110.

[106] Kalcklosch M，Kyriakopoulos A，Hammel C，et al. A new selenoprotein found in the glandular epithelial cells of the rat prostate. Biochem Biophys Res Commun，1995，217（1）：162-170.

[107] Feng W，Li B，Liu J，et al. Study of chromium-containing proteins in subcellular fractions of rat liver by enriched stable isotopic tracer technique and gel filtration chromatography. Anal Bioanal Chem，2003，375（3）：363-368.

[108] van Hulle M，de Cremer K，Cornelis R，et al. *In vivo* distribution and speciation of [^{114m}In]$InCl_3$ in the Wistar rat. J Environ Monit，2001，3（1）：86-90.

[109] van Hulle M，de Cremer K，Cornelis R. Study of the binding of ^{114m}In radiotracer to human serum components by ultrafiltration and chromatography. Fresenius′ J Anal Chem，2000，368（2-3）：293-269.

[110] Thomson C D. Selenium speciation in human body fluids. Analyst，1998，123（5）：827-831.

[111] Schwarz A，Heumann K. Two-dimensional on-line detection of brominated and iodinated volatile organic compounds by ECD and ICP-MS after GC separation. Anal Bioanal Chem，2002，374（2）：212-219.

[112] Heumann K G. Isotope-dilution ICP-MS for trace element determination and speciation：From a reference method to a routine method？Anal Bioanal Chem，2004，378（2）：318-329.

[113] Wang M，Feng W，Lu W，et al. Quantitative analysis of proteins via sulfur determination by HPLC coupled to isotope dilution ICP-MS with hexapole collision cell. Anal Chem，2007，79：9128-9134.

[114] Shi J，Feng W，Wang M，et al. Investigation of mercury-containing proteins by enriched stable isotopic tracer and size-exclusion chromatography hyphenated to inductively coupled plasma-isotope dilution mass spectrometry. Anal Chim Acta，2007，583（1）：84-91.

[115] Sariego Muniz C，Marchante Gayon J M，Garcia Alonso J I，et al. Speciation of essential elements in human serum using anion-exchange chromatography coupled to post-column isotope dilution analysis with double focusing ICP-MS. J Anal At Spectrom，2001，16（6）：587-592.

[116] Prange A，Schaumlöffel D，Brätter P，et al. Species analysis of metallothionein isoforms in human brain cytosols by use of capillary electrophoresis hyphenated to inductively coupled plasma-sector field mass spectrometry. Fresenius′ J Anal Chem，2001，371（6）：764-774.

[117] Schaumlöffel D，Prange A，Marx G，et al. Characterization and quantification of metallothionein isoforms by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-isotope-dilution mass spectrometry. Anal Bioanal Chem，2002，372（1）：155-163.

[118] Wang Z，Prange A. Use of surface-modified capillaries in the separation and characterization of metallothionein isoforms by capillary electrophoresis inductively coupled plasma mass spectrometry. Anal Chem，2002，74（3）：626-631.

[119] Ferrarello C N，Ruiz Encinar J，Centineo G，et al. Comparison of three different ICP-MS instruments in the study of cadmium speciation in rabbit liver metallothionein-1 using reversed-phase HPLC and post-column isotope dilution analysis. J Anal At Spectrom，2002，17（9）：1024-1029.

[120] Goenaga Infante H，Campenhout K V，Schaumloffel D，et al. Multi-element speciation of metalloproteins in fish tissue using size-exclusion chromatography coupled “on-line” with ICP-isotope dilution-time-of-flight-mass spectrometry. Analyst，2003，128（6）：651-657.

[121] Rodriguez-Cea A，del Rosario Fernandez de la Campa M，Blanco Gonzalez E，et al. Metal speciation analysis in eel（*Anguilla anguilla*）metallothioneins by anionic exchange-FPLC-isotope dilution-ICP-MS. J Anal At Spectrom，2003，18（11）：1357-1364.

[122] Hinojosa Reyes L，Marchante-Gayon J M，Garcia Alonso J I，et al. Quantitative speciation of selenium in human serum by affinity chromatography coupled to post-column isotope dilution analysis ICP-MS. J Anal At Spectrom，2003，18（10）：1210-1216.

[123] Diaz Huerta V，Hinojosa Reyes L，Marchante-Gayon J M，et al. Total determination and quantitative speciation analysis of selenium in yeast and wheat flour by isotope dilution analysis ICP-MS. J Anal At Spectrom，2003，18（10）：1243-1247.

[124] Diaz Huerta V，Fernandez Sanchez M L，Sanz-Medel A. Quantitative selenium speciation in cod muscle by isotope dilution ICP-MS with a reaction cell：Comparison of different reported extraction procedures. J Anal At Spectrom，2004，19（5）：644-648.

[125] Gelaude I，Dams R，Resano M，et al. Direct determination of methylmercury and inorganic mercury in biological materials by solid sampling-electrothermal vaporization-inductively coupled plasma-isotope dilution-mass spectrometry. Anal Chem，2002，74（15）：3833-3842.

[126] Infante H G，van Campenhout K，Blust R，et al. Anion-exchange high performance liquid chromatography hyphenated to inductively coupled plasma-isotope dilution-time-of-flight mass spectrometry for speciation analysis of metal complexes with metallothionein isoforms in gibel carp（*Carassius auratus gibelio*）exposed to environmental metal pollution. J Chromatogr A，2006，1121（2）：184-190.

[127] Baranov V I，Quinn Z A，Bandura D R，et al. The potential for elemental analysis in biotechnology. J Anal At Spectrom，2002，17（9）：1148-1152.

[128] Baranov V I，Quinn Z A，Bandura D R，et al. A sensitive and quantitative element-tagged immunoassay with ICPMS detection. Anal Chem，2002，74（7）：1629-1636.

[129] Kinoshita E，Takahashi M，Takeda H，et al. Recognition of phosphate monoester dianion by an alkoxide-bridged dinuclear zinc(Ⅱ)complex. Dalton Trans，2004，（8）：1189-1193.

[130] Lilley K S，Dupree P. Methods of quantitative proteomics and their application to plant organelle characterization. J Exp Bot，2006，57（7）：1493-1499.

[131] Ong S E，Foster L J，Mann M. Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics. Methods，2003，

29（2）：124-130.

[132] 李树龙，姜颖，贺福初. 稳定同位素标签技术在定量蛋白质组研究的应用. 生命的化学，2005，25：362-365.

[133] Chen C，Chai Z，Gao Y. Nuclear Analytical Techniques for Metallomics and Metalloproteomics. Cambridge：RSC Publishing，2010.

[134] Ascone I，Fourme R，Hasnain S，et al. Metallogenomics and biological X-ray absorption spectroscopy. J Synchrotron Rad，2005，12（1）：1-3.

[135] Corbett M C，Tezcan F A，Einsle O，et al. Mo K- and L-edge X-ray absorption spectroscopic study of the ADP.AlF4-stabilized nitrogenase complex：comparison with MoFe protein in solution and single crystal. J Synchrotron Rad，2005，12（1）：28-34.

[136] Hasnain S S，Hodgson K O. Structure of metal centres in proteins at subatomic resolution. J Synchrotron Rad，1999，6（4）：852-864.

[137] Pohl E，Haller J C，Mijovilovich A，et al. Architecture of a protein central to iron homeostasis：Crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. Mol Microbiol，2003，47（4）：903-915.

[138] Latimer M J，Ito K，McPhillips S E，et al. Integrated instrumentation for combined polarized single-crystal XAS and diffraction data acquisition for biological applications. J Synchrotron Rad，2005，12（1）：23-27.

[139] Hall J F，Ellis M J，Kigawa T，et al. Towards the high-throughput expression of metalloproteins from the *Mycobacterium tuberculosis* genome. J Synchrotron Rad，2005，12（1）：4-7.

[140] Jenney F E，Jr，Brereton P S，Izumi M，et al. High-throughput production of *Pyrococcus furiosus* proteins：Considerations for metalloproteins. J Synchrotron Rad，2005，12（1）：8-12.

[141] Harris R L，Prudencio M，Hasnain S S，et al. Heterologous metalloprotein biosynthesis in *Escherichia coli*：Conditions for the overproduction of functional copper-containing nitrite reductase and azurin from *Alcaligenes xylosoxidans*. J Synchrotron Rad，2005，12（1）：13-18.

[142] Benfatto M，Della Longa S，Natoli C R. The MXAN procedure：A new method for analysing the XANES spectra of metalloproteins to obtain structural quantitative information. J Synchrotron Rad，2003，10（1）：51-57.

[143] Rehr J J，Kozdon J，Kas J，et al. Bayes-Turchin approach to XAS analysis. J Synchrotron Rad，2005，12（1）：70-74.

第 3 章　金属组学与其他学科的交叉

3.1　研究生命体系中金属离子的前沿交叉学科

众所周知，至少有 25 种元素是生命活动必需的，而且绝大部分是金属和类金属，它们在生物体系的生理和病理中起到十分重要的作用。铁、铜、锌、钴、钼和硒等 20 种矿物元素是生命必需的微量元素；镉、汞和铅等重金属是潜在的毒素，这类元素在细胞内的浓度必须得到严格的控制；铂、金、砷等化合物作为金属药物或诊断试剂已广泛用于临床。同时，生命体内约 1/3 蛋白质为金属蛋白或金属结合蛋白，并且近一半的金属酶需要金属离子（通常为过渡金属，如铜、铁、锌或钼）作为辅因子来完成催化过程[1]。

1995 年，Venter 等首先测出流感嗜血杆菌（*Haemophilus influenzae*）的基因序列，特别是 2000 年人类基因组测序完成，生物学中各类“组学”（omics），如基因组学和随后应运而生的蛋白质组学、转录组学、表观基因组学以及代谢组学得到迅速的发展。其中比较常见的是基因组学和蛋白质组学，前者侧重于生命体系的全基因序列的测定，而后者主要研究细胞、组织和器官中蛋白质的分布、结构、功能和相互作用。组学是一种利用高通量分析技术来研究生命体系中一些特定组分的新方法，它完全改变了以往研究生物分子及其相互作用和功能关系的方式。利用组学方法能从实验分析中获得大量与生物体相关的数据，如生物体中所有的代谢通路和它们在多种生物体之间的联系及对比。获得大量的实验数据后则需要建立完善的数据库以及开发有效的工具来查阅、分析和比较相关数据，因此，生物信息学成为组学研究领域必不可少的方法学。

“金属组”这一概念由牛津大学的 Williams 于 2001 年提出并用来描述因生物细胞和器官对金属元素的选择而产生的元素分布模式[2]。Haraguchi 于 2002 年在日本举行的国际生物微量元素研讨会上提出金属组学（metallomics）来统合生物微量元素研究的各个学科领域[3]。金属组学作为一门新兴的前沿交叉学科，是对若干与金属相关生命过程的分子机理以及对细胞与组织内全部金属离子和金属配合物进行综合研究的学科。与基因组学中的基因组和蛋白质组学中的蛋白质组类似，在金属组学中，生命体系中所有的金属蛋白、金属酶以及其他含金属的生物分子及其元素分布、自由金属离子的平衡浓度或者在某个细胞器、细胞和组织中的自由元素的组成统称金属组。除了对金属组本身的研究，金属组与基因组、

转录组、蛋白质组和代谢组等其他组学的相互作用关系研究也是金属组学的重要内容（图 3-1）。



图 3-1　金属组学与其他学科的交叉示意图

金属组学的研究，通常需要特定的分析方法和手段来完成金属元素在体内组分分布、识别、量化、体外功能分析以及生物信息学的预测等。因此金属组学是一门致力于全面系统地研究生物体系中金属离子的吸收、转运、利用、功能和储存并且与其他组学相辅相成的前沿交叉学科[4]。金属组学中一个重要的领域是金属蛋白质组学（metalloproteomics），即对金属蛋白中与蛋白质相互作用的金属离子功能的研究。目前，与基因组学和蛋白质组学相比，金属组学的研究仍然处于初级阶段，但基因组学与蛋白质组学等组学的迅速发展为金属组学提供了大量的数据资料以及很多能快速推进其发展的关键技术。现代光源（核分析技术）及高灵敏度无机质谱的发展为金属组学提供了技术支撑。下面将详细介绍金属组学与其他组学的交叉研究。

3.1.1　金属蛋白质组学：金属组学与蛋白质组学的交叉

生物体系内的微量元素大多数与蛋白质结合，将一个蛋白质组中所有的金属蛋白或具有金属结合位点的所有蛋白质称为金属蛋白质组（metalloproteome），

相应的金属蛋白质组学则主要研究一个蛋白质组内所有金属蛋白的结构、金属的配位环境、蛋白质功能和构效关系[5]。金属蛋白质组学研究可使我们了解金属蛋白的生物合成过程，包括一系列翻译后过程，如修饰、金属吸收、转运、分子组装等以及微配位环境对这些过程的影响，了解微量元素的生物效应及其机理以及微量元素相关的疾病发生机理，并为金属药物的设计提供依据。人们还希望通过金属蛋白质组学研究最终实现由一个新的基因序列预测其所表达金属蛋白的功能（功能基因组学）。与蛋白质组的研究思路相似，金属蛋白质组学研究路线可以归纳为：用全息样品制备技术从各种生理病理条件下的器官、组织，培养的细胞中提取并分离蛋白质，表征金属蛋白序列、结构和功能，分析各个蛋白质的微量元素组成及其金属的功能，其中，样品中蛋白质结构的表征和金属蛋白的物种分析是至关重要的研究步骤。

金属蛋白质组学研究通常将一种或两种高分辨率的分离技术与高灵敏度的分子或金属鉴定方法联用[6]。金属螯合亲和色谱（immobilized metal affinity chromatography，IMAC）常用于金属蛋白的预分离和富集。通过改变色谱柱中的固定金属，如镍、铜、锌等，该方法可全面地分离富集生物样品中所有能与固定金属有亲和作用的蛋白质/肽段。尽管 IMAC 的分离条件与生理条件存在一定差别，且该方法存在一定的局限性，如金属结合位点在表面的蛋白质更易被分离鉴定，然而利用 IMAC 技术成功分离鉴定的金属蛋白已被大量报道。二维凝胶电泳（two-dimensional gel electrophoresis，2D-GE）将等电聚焦电泳与 SDS-PAGE 结合，是一种分辨率较高的蛋白质电泳分离技术，可同时分离上百种蛋白质。此外，广泛应用于蛋白质组学中的多维液相色谱分离技术（liquid chromatography，LC）在金属蛋白的分离技术中依然是目前相对成熟可靠的方法。由于生物样品的复杂性，此类分析往往需要进行多维液相分离，根据蛋白质的不同性质将生物样品中的蛋白质混合液分成多个组分进行后续分析，以达到最佳分离效果。然而，由于目前并没有关于金属蛋白在凝胶或色谱分离体系中稳定性的系统报道，对于金属蛋白在分离过程中的金属流失情况仍然是一个亟须解决的问题，并应引起研究者的注意。不同类型的质谱分析技术，如基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry，MALDI-TOF-MS）、电喷雾电离质谱（electrospray ionization mass spectrometry，ESI-MS）和串联式质谱（tandem mass spectrometry，MS/MS），通过在线或离线与蛋白质分离技术联用，是蛋白质鉴定的常用手段。然而，若要同时鉴定蛋白质与其在生物组织或细胞内结合的金属/类金属元素，则需要通过高分辨率的蛋白质分离技术与高灵敏度的金属检测技术在线联用来实现。近来，有大量将凝胶蛋白分离（如 2D-GE）与激光烧蚀 ICP-MS（laser ablation ICP-MS，LA-ICP-MS）或 X 射线荧光光谱技术等联用来研究金属与其结合蛋白相关信息的报道。

本课题组曾利用 IMAC 和 2D-GE 从幽门螺杆菌中分离鉴定了 22 种镍结合蛋白，这些蛋白质主要参与细胞内氧化还原及酸碱平衡和细菌代谢等。利用相似的方法，Sarkar 等从肝癌细胞 HepG2 中分离鉴定了 67 种铜及锌结合蛋白质，其中大部分蛋白质具有金属结合位点，$C(X)_nC$(n=2～4) 或者 $H(X)_mH$(m=0～5)。最近，我们设计了连续流动凝胶电泳与 ICP-MS 联用系统（gel electrophoresis coupled with ICP-MS，GE-ICP-MS），并成功利用该装置分离鉴定出幽门螺旋杆菌中 7 种铋结合蛋白。

Nielsen 等开创了将凝胶电泳/激光烧蚀（GE-LA）技术与 ICP-MS 联合使用的新技术（GE-LA-ICP-MS），因其具有较高的解析度而引起了人们的关注。在电泳分离阶段，必须考虑十二烷基磺酸钠的浓度、pH 以及电场大小，以求达到最理想分辨率的同时保留金属-蛋白质复合物的自然状态。在传统的电泳检测方法后，利用放射自显影的方法对凝胶电泳进行检测。这项技术的最大限制在于必须使用放射性标记的金属进行分析。相对来说，激光烧蚀（LA）与 ICP-MS 联用是一种更简便、更具竞争力的替代检测方法。随着检测下限下降到皮摩尔每升（10^{-12}mol/L），且生物材料中有充足形态的微量元素，可以利用自然界的同位素以及多种元素同时检测的技术。在一个标准的 GE-LA-ICP-MS 实验过程中，约束在一维或二维蛋白胶上的激光束通过切割或者打洞的方式分离出样品，并通过连续氩气运载至 ICP-MS 进行质谱鉴定。这种方法的有效性通过藻青菌中的研究较透彻的锌和镉结合金属硫蛋白进行了验证，并用来寻找和确认大肠杆菌细胞质中的锌和镉结合蛋白。值得注意的是，金属-蛋白质复合物与共价键的蛋白质在蛋白胶中的解析度差别较大，这使得非变性电泳的解析度成为 GE-LA-ICP-MS 应用中的瓶颈。

利用同步辐射 X 射线荧光（synchronous radiation X-ray fluorescence，SRXRF）对脐橙蛋白条带的扫描发现其含有 Ca、Cu、Fe、K 及 Zn，随后通过火焰原子发射/吸收光谱法对其定量检测。在另一个实验中，对人类肝脏中癌细胞金属蛋白的分布进行了检测，通过等电聚焦对肿瘤的线粒体、细胞液及其周围正常组织的线粒体细胞液含 Zn、Cu、Fe 及 Mn 的蛋白质进行分离，并通过 SRXRF 进行检测。结果发现，对于胞浆蛋白，肿瘤组织的条带比周围正常组织的条带要低，而在线粒体中的金属蛋白，两组细胞的结果相近，这表明不同金属离子的比例可能会影响肝组织中肿瘤的生长。

3.1.2　金属代谢组学：金属组学与代谢组学的交叉

代谢组学（metabolomics）是在后基因组学时代兴起的一门跨领域学科，其主要目标是定量地研究生命体对外界刺激、病理生理变化以及本身基因突变而产生的体内代谢物水平的多元动态反应。由于代谢物处于生物系统生化活动调控的末端，包含着反映生理表型的直接而全面的生物标记物信息，因此，代谢组学日益成为整体性研究生命体系功能变化非常有力的分析手段。其中，代谢物组是一

个生命体内所有代谢物的总和。与基因组学和蛋白质组学相比，代谢组学侧重于相关特定组分的共性研究。

与金属蛋白质组学不同的是，目前还没有代谢物与基因直接关系的记载，因此代谢物的鉴定很难通过基因组得到相关信息，而是需要高分辨率技术的支持。少数情况下，当某种金属结合的代谢物在植物里富集、占主导地位时，金属代谢物能用 X 射线吸收光谱技术（X-ray absorption spectroscopy，XAS）来直接测定。否则，在金属代谢组学中，金属代谢物的分析需要利用色谱或电泳先进行分离，再用高精度质谱或多级质谱来检测金属物种或进一步分析。X 射线吸收近边结构（X-ray absorption near edge spectroscopy，XANES）能提供金属配合物的氧化态、共价特性、配位数以及分子对称性等相关信息。扩展 X 射线吸收精细结构（extended X-ray absorption fine structure，EXAFS）则提供金属附近原子的结构信息，如配体数目、金属与配体间的距离等。即使样品没有进行粗提取和结晶，XAS 也能对样品直接进行测定，同时，它是一种定量技术，但其检测限为几十 ppm[①]，并不是特别灵敏。XAS 的分析需要与标准谱进行对比，因此当单个（或者最多两个）主要物种存在时，XAS 是非常实用的，而如果被检测的金属有多个物种混合，XAS 谱线的解释将变得非常困难。

在金属代谢组学中，XAS 在探测动力学不稳定（样品处理时易发生分解或者配体交换）的配合物上具有独特的优势。XANES 曾被成功用来监测植物中锌在磷酸盐、半胱氨酸和组氨酸中的定量分配。EXAFS 曾被用来鉴定出在镍超富集植物 Leptoplax 叶子中柠檬酸是镍结合的主要配体。由于同步辐射加速器的普及以及能避免样品前处理等优点，XAS 的应用越来越广泛。但是该技术只能用来确定样品中预期物种的存在，无法用来寻找新物种的特点，这限制了它的应用。因此，质谱等具有更高灵敏度的检测方法在金属代谢组学中占有不可取代的重要地位。质谱分析中，以下一些重要因素决定了能否提高信噪比，成功获取金属代谢物的质谱信息：离子化效率、物种本身、离子化条件、缓冲液浓度、是否有污染物存在等，正是有这些干扰因素的存在，在金属代谢组学中，质谱总是与其他的分离技术联用。用高效液相色谱（high performance liquid chromatography，HPLC）进样能提高鉴定的可能性，Weber 等成功鉴定出在拟南芥木质部镍与苹果酸、组氨酸、柠檬酸和烟草胺的结合。然而，简单的 HPLC-ESI Q-TOF MS/MS 通常不能给出完整的结果，也不能完成多物种检测。

与金属蛋白质组学相似，金属代谢组学需要将一种或两种高分辨率的分离技术与高灵敏度的分子或金属鉴定方法联用。由于受金属的化学环境、分离缓冲液、洗脱液等的干扰小，ICP-MS 非常适合于色谱分离后金属代谢物的检测。此外，ICP-MS 能定量检测分析物的回收率，这个必要参数在 ESI-MS 中是无法检测的。代谢物高

① $1ppm=10^{-6}$。

极性、低疏水性的特点使得亲水性相互作用色谱（hydrophilic interaction liquid chromatography，HILIC）常被用作金属代谢物的分离以及 MS 的进样系统。HILIC 通常采用极性/亲水性基团（酰氨基、氰基和氨基等）作为固定相，为了与电喷雾源兼容，流动相则常用乙腈、甲醇以及低浓度和易挥发性的水溶液等。该技术已被成功用来分析酵母中的硒代谢物。在实际应用中，飞行时间质谱（TOF-MS）对样品分子质量进行精确分析时样品量的需求通常在几十 ppm。因此，代谢物分子质量的精确分析需要使用快速傅里叶变换［如 FT 离子回旋共振或静电离子阱（轨道阱）］，其优点是动态范围广，比 TOF-MS 高至少一个数量级。利用 TOF 根据分子式鉴定化合物时精度不高的问题可以用串联质谱来解决。自从首次用 ESI-MS/MS 鉴定出未知硒代谢物开始，很多砷在海洋生物群中的代谢物、硒在酵母中的代谢物以及植物和临床样品中金属配合物等逐渐被鉴定出来。然而，多数情况下能识别的只是大量代谢物中的极少数部分。利用高分辨多级质谱可以实现金属代谢物的系统化从头鉴定。简单来说，母离子可以被碎片化为子离子，而子离子可以进一步被打碎成可明确通过分子质量来鉴定的小碎片，这样就可以通过精确质量测定获得母离子的经验式。FT-MS 相对于 TOF-MS 的优点是即使在 MS^4 上也能保证高质量精度，同时，检测窗口也允许代谢物的同位素模式的分析[7]。

总而言之，金属代谢物鉴定的通用方法是联合使用色谱分离技术和 ICP-MS/FT-MS 检测技术。第一步是确定样品中金属代谢物的数量同时证明它们的浓度即为要测定元素的总浓度。ICP-MS 检测 HPLC 或毛细管电泳分离后的产物是一种不仅能优化分离条件，还能不间断检测物种回收率以及分离时稳定性的有力工具。与 ESI-MS 不同的是，其选择的分离机理和条件不会被信号或灵敏度等问题损害。因此，在热力学稳定性和动力学惰性允许的情况下，能获得样品中所有金属物种的信息。值得注意的是，为获得高分离效率，通常需要用相对浓缩的缓冲液，而 ESI-MS 在高浓缓冲液条件下不会产生较好信号，因此 ICP-MS 在检测此种条件下的物种信号时具有独特的优势。第二步则包括寻找能做到定量回收的同时又对所分析的化合物有最大分离度的分离技术。HILIC 是实现这些目标的最好方法；ICP-MS 检测也是验证定量回收必需的技术。第三步则包括通过获取 HILIC-FT-MS 色谱图和数据来找出样品中存在的金属代谢物种。我们可以从阴离子交换 HPLC-ICP-MS 中得知能够检测到的金属代谢物的数量，如果鉴定出的物种不足，则暗示样品准备过程中存在分离或纯化不足的问题。方法最后完成检测是通过 MS^n 来鉴定出打碎的片段、母离子以及对应的化合物。

3.1.3　金属组学与基因组学的交叉

基因组是指生物体的 DNA（部分病毒是 RNA）中的全部遗传信息，基因组学则是研究生物基因组及如何利用基因的学科。基因组学与金属组学的交叉主要

体现在生物体的基因型对其元素含量和分布的影响以及基因组与金属蛋白质组及金属代谢组的相互关系上。

研究生物体某些特定基因对其元素信息的影响，主要是通过收集生长到特定阶段的 4000～6000 个突变生物体，分析它们的元素组成来研究某个特定基因存在或敲除时对生物体中的金属浓度增加或降低的影响。与参照物对比，则可以分析出突变生物中富集或者贫乏的特定元素并找到与之相关的特定基因。该方法能检测出植物中参与矿物质离子积累的基因网络，但是该方法得以实行的两个前提条件是：被研究的模型生物能够提供大量的突变集合体（目前这样的模型生物非常有限），另外需要高通量多元素分析技术（通常为 ICP-MS 和 ICP-AES）。Salt 等研究了拟南芥中大量痕量元素［包括辅酶因子（Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、Se 和 Mo 等）以及一些有毒元素（如 As、Cd 和 Pb 等）］的分布与基因组的关系。通过校准所测定元素的平均信号可以对其浓度进行相对定量测定。51 种来自 6000 个突变拟南芥的不同元素分布谱图证实了大多数的突变体中不止一种元素而是很多种元素的浓度发生改变。该研究很好地解释了生物体的基因组与金属组在生物学上的相关性[8]。

蛋白质是由基因表达而来，因此基因组和蛋白质组之间有直接的相互联系。单个基因的克隆以及随后的异源蛋白表达是识别蛋白中金属结合序列的有效实验方法。假设这样的蛋白质序列在不同的有机体中高度保守，那么金属蛋白的结构在一定程度上能用生物信息学的方法通过基因组搜索来预测。然而，目前还不清楚的是由个体基因表达得到的蛋白质保留其生物相关性到何种程度。金属位点的形成通常需要翻译后修饰（PTM），其可以改变酶的活性、结合位点以及蛋白质的结构等。在各种翻译后修饰的类型中，蛋白质的磷酸化是最常见的，蛋白质的磷酸化就是在丝氨酸（约 90%）、色氨酸（约 10%）以及酪氨酸（约 0.05%）的侧链添加磷酸酯基团。磷酸化是可逆且迅速的，它可以精确地调控蛋白质的性质，因此影响许多关键的生命过程，如蛋白质与蛋白质之间的相互作用、细胞信号、细胞骨架的重新利用、细胞周期以及细胞间的相互作用。蛋白质磷酸化也在一定程度上成为沟通基因组学和蛋白质组学的桥梁。因此，对蛋白质磷酸化程度的研究是十分重要的。传统地对磷酸化的研究是通过对 ATP 或磷酸盐中的放射性元素 ^{32}P 或者 ^{33}P 与蛋白质的共价结合来研究的，但这种方法有其固有的缺点。随后发展起来的则是结合金属蛋白质组学的研究方法，如利用 IMAC、化学修饰、强阳离子交换色谱法（SCX）、抗磷酸化酪氨酸抗体对磷酸化蛋白质进行富集，然后利用 ESI/MAIDI-MS/MS 或 ICP-MS 进行鉴定。

虽然基因组和金属代谢组之间的相关性不如基因组和金属蛋白质组之间那么显著，甚至有时不存在直接关联性。但是，目前在该领域的一些尝试已经取得一定进展。例如，Nishizawa 等将遏蓝菜（*Thlaspi caerulescens*，一种多金属超富集

模型植物）的基因库用酵母表达并生产出约 400 000 个克隆体。经过致死镍浓度毒性试验测试，它们中只有一小部分存活并产生镍抗性酵母细胞群体。通过体积排阻液相色谱/毛细管电泳与 ICP-MS 以及 ESI-MS/MS 联用进行镍代谢物分离和鉴定分析，结果显示检测到的串联质谱信号对应单一镍络合配体并且其与镍烟酰胺标准物一致。因此，确定镍烟酰胺是遏蓝菜中唯一的镍络合物。酵母的 DNA 分析显示其存在一个基因与烟酰胺合成酶的编码基因有 98%的相似度，而该酶与细胞代谢以及铁的运输相关。

3.2　生物无机化学与金属组学关系

金属组学中的金属元素，不仅包括与蛋白质和酶结合的金属，还包括金属-核酸、金属-小分子配体（有机酸等）、金属-多糖、自由离子以及不同价态等所有存在形式，金属组学研究对于全面阐述金属元素在生物体内的富集、代谢机理及其生物功能，对于理解各种重要的生物学现象将有重要意义。具体来讲，金属组学的研究内容包括：生物体液、细胞、器官中元素的分布和形态分析；应用模型络合物阐释金属组催化反应机理；金属蛋白和金属酶的鉴定、结构和功能解析；生物分子和金属的代谢研究；化学治疗中的无机药物的设计；基于多元素分析的与微量元素相关的健康和疾病的医学诊断；地球上生命体系的化学演变；金属在医学、环境科学、食品科学、农业、毒物学、生物地质化学以及其他金属辅助功能性生物科学中的作用。金属组学是一门新兴的前沿交叉学科，它与生物无机化学、环境化学、药物化学、植物生物化学/生理学以及营养学等多种学科相互交叉。它致力于通过对基因、蛋白质、新陈代谢以及生物系统中其他生物分子与金属的相互作用研究来了解生物体功能的分子机理。目前，有以下一些具体问题亟待解决：金属蛋白的结构-功能分析；生物体系中金属蛋白的分析识别和生物痕量元素的化学分析；金属离子的生物调控及代谢；与痕量金属元素有关疾病的医学诊断以及金属药物的应用。

生物无机化学是 20 世纪 60 年代以来逐步形成的无机化学、生物化学、医学等多种学科交叉的领域。其研究对象是生物体内的金属（和少数非金属）元素及其化合物，特别是痕量金属元素和生物大分子配体形成的生物配合物，如各种金属酶、金属蛋白等，侧重研究它们的结构-性质-生物活性之间的关系以及在生命环境内参与反应的机理。为便于研究，人们常用人工模拟的方法合成具有一定生理功能的金属配位化合物来模拟金属活性中心。生物无机化学近期研究热点包括：金属蛋白和金属酶的结构和性质；金属离子及其配合物与生物大分子的相互作用；研究金属作为 DNA 探针，与 DNA 的定位结合，DNA 定位切割的金属核酸酶；DNA 分子光开关；电子传递反应；基因芯片；生物矿物等。因此，从研究内容上

看，金属组学与生物无机化学是既有交叉（主要交叉在金属离子及其配合物与生物大分子的相互作用以及金属药物的研究上）又相辅相成的学科。

近几年来，传统生物无机化学研究受到一系列实际问题的挑战。归结起来，这些实际问题大多涉及无机物的生物效应，换言之即为生物体对无机物的应答问题，如无机药物的作用机理、无机物中毒机理、环境物质损伤生物体的机理等。在这类问题的研究中，共同的核心问题是从分子、细胞到整体三个层次回答构成药理、毒理作用的基本化学反应和这些反应引起的生物事件。这类研究促使人们把生物无机化学提高到细胞或活体层次来研究细胞和无机物作用时细胞内外发生的化学变化。这些化学变化是生物效应的基础。然而，解决这些实际问题在很大程度上依赖于新技术的发展。金属组学的快速发展建立在吸纳其他组学的新兴高通量技术上，其研究内容上的拓展和方法技术上的快速更新为传统生物无机化学注入新鲜血液，促进其快速发展，特别是在金属蛋白和金属药物的研究上。生物无机化学倾向于表征金属蛋白的结构和功能、设计和研究新型金属药物以及设计金属的活性中心模拟物来展开相关研究，而金属组学侧重于利用新兴高通量分析技术解决实际问题。

下面将从分析技术的角度阐述金属组学和生物无机化学在金属蛋白研究领域的相辅相成作用。关于金属药物的介绍将在 3.3 节详细展开。

3.2.1　金属组学研究方法

作为最常用的定量生物体内金属含量的研究方法，电感耦合等离子体质谱（ICP-MS）具有快速、灵敏、高通量等特点。该方法可同时检测多种元素，适用于分析金属药物的药物代谢动力学，如用于定量检测金属药物在不同细胞区室的吸收和分布。ICP-MS 与激光烧蚀联用技术（LA-ICP-MS）具有较高的空间分辨率（＜1μm）和灵敏度，近年来被广泛用于金属或金属药物在生物样品内的定量原位成像，从而直观地展现金属物质在细胞内的分布状况[9]。近年来，时间分辨电感耦合等离子体质谱（time-resolved ICP-MS）用于单细胞内的元素分析受到了广泛关注。该方法可提供大量关于细胞与细胞之间差异的信息，有助于了解处于不同生长周期的细胞对金属物质的利用情况。电感耦合等离子体飞行时间质谱（ICP time-of-flight mass spectrometry，ICP-TOF-MS）采用与流式细胞技术相似的概念，可在单细胞水平上进行多参数分析，为单个细胞对金属药物的反应提供更深入详尽的信息[10]。

现代核技术因具备多元素检测性能、灵敏度高、准确度和精确度好、本底效应低、非破坏性以及原位监测等特点在金属蛋白、金属药物作用机理等研究中发挥着重要作用。随着第三代同步微探针光束线（synchrotron microprobe beamline）设备的完善，SRXRF 用于检测元素在生物组织、细胞区室甚至单细胞中的分布得

到了越来越多的关注，该方法的空间分辨率可提高到亚微米（0.05μm）水平，检测灵敏度可达到微克及以下水平，优化条件下可以达到更高。当原子受到足够能量的基础 X 射线的撞击后，核内的电子被撞击出去，使核处于激发状态，激发态的核可以发出特征性的谱线，这就可以提供照射区域样品的元素组成。X 射线微光束有很高的空间分辨率（约为 0.1μm），且样品深度可达 1mm，可以用来对细胞内痕量元素分配定位的分析，如通过 SRXRF 微光束检测绘制酿酒酵母以及人类癌细胞的痕量元素 Fe、Zn 及大量元素 P、S、Cl、K 等的分布图谱。同样的方法也被用于亚细胞结构的线粒体及高尔基体中的铜离子定位。在 SRXRF 实验前可加上如液相色谱或凝胶电泳的分离技术来分离检测生物样本中所含金属离子。

此外，X 射线吸收光谱技术为研究金属中心在细胞内的化学变化提供了非常有价值的帮助。该方法通过探测细胞内金属的氧化价态、配位原子的性质及个数从而得到相应的金属配位环境信息，已成功应用于监测金属药物在细胞介质中的生物转化，包括氧化态变化。其他核分析技术如分子活化分析（MAA）、质子激发 X 射线荧光分析（PIXE）、同位素稀释技术（ID）、同位素标记技术等已广泛用于生物体系中金属蛋白和金属药的化学形态分析。而 EXAFS、XANES、中子散射和穆斯堡尔谱等技术则是蛋白质结构以及金属结合位点结构分析的有力武器。

金属组学中高灵敏度高通量分析技术的发展也为解决生物无机化学中的实际问题（如金属蛋白催化机理、金属药物作用机理等）提供了强有力的手段。

3.2.2　蛋白质结构和功能研究

对蛋白质结构的描绘是理解其功能以及结构与功能之间联系的基础。X 射线晶体衍射与核磁共振是研究生物分子结构的常用工具。其他的一些技术，如穆斯堡尔谱、XAS、电子顺磁共振（EPR）、共振拉曼光谱（RR）以及磁圆二色谱（MCD）在金属蛋白中金属结合位点的详细结构特征研究中是必需的。下面将详细介绍 XAS 在金属蛋白的结构-功能研究中的应用。

XAS 是一种非破坏性技术，其原理是分析同步加速辐射源产生 X 射线的光子，被元素吸收后获得光谱，接着检测所产生的荧光强度。XAS 是根据 X 射线的能量，分成两个区：近边区（XANES）和扩展边区（EXAFS）。XANES 能给出氧化状态、共价键、分子对称性以及配位数的信息；而 EXAFS 给出的是关于金属结合环境如配位数目、配体的识别（配位的元素如 O、N、S）以及金属与配体间距离的结构信息。XAS 可以方便地检测环境与生物样品中金属与金属配合物结构-功能的关系（如空间布局、元素的化学形态、金属的氧化状态），并且已经得到广泛应用。例如，该方法被用来研究人类肺细胞中 Cr(Ⅵ) 随时间的摄取与

分配以及人卵巢细胞中铬的氧化态。结果发现在体外铬酸盐复合物的可溶性几乎决定了铬的氧化状态：在细胞中可溶的 Cr(Ⅵ) 盐被还原成为 Cr(Ⅲ)，而当细胞暴露于不可溶的（微溶的）铬酸盐复合物时有部分铬仍保持 Cr(Ⅵ) 的形态。

其他结构检测方法如 NMR 和 X 射线晶体衍射，这些技术可以联合运用来鉴定金属的配位环境。考虑到原子核内部测定的高精确性（0.0001～0.001nm），EXAFS 非常适用于检测金属结合位点发生的氧化还原或底物结合变化，因为这类反应结构的改变通常小于 0.01Å，远超出了蛋白质结晶谱学的精确值（大约 0.15Å）。通过联合使用 EXAFS、前稳态动力学和计算群论化学的技术，人们得到了锌催化位点的配位数、结构以及伴随的金属配位键的键长的改变。XAS 可与 NMR 联合使用解析溶液中金属蛋白的结构。NMR 能够提供金属蛋白中的质子间距离、二面角以及原子内向量这些结构信息。单独使用 NMR 确定金属中心是不可能的，EXAFS 的数据则能提供一些互补的信息，正如在研究细菌中铜转运蛋白中所体现的那样。

阿尔茨海默病（Alzheimer's disease，AD）是一种神经逐步退行性疾病，伴有 β-淀粉样蛋白（Aβ）的沉积。Aβ 通常是以可溶的形式出现在生物液体中，它的结构从自然状态过渡到 β 片层聚集形态，并伴随并行增加神经毒素的功能。越来越多的证据表明在 AD 影响的大脑中，过渡金属如铜、铁参与了淀粉样蛋白沉淀升高的反应，铜在 Aβ 中准确的结合位点可能是 AD 病因的关键。目前 XAS 对 Aβ-Cu^{2+}的研究发现，蛋白质与金属离子之间是以 1∶1 的比率结合的，说明 Cu^{2+}可能与三个组氨酸（His6、His13、His14）上三个氮键合（键长 0.185～0.194nm）以及两个氧原子（一个键长 0.200nm，来自 Tyr10；另一个键长 0.191nm，属于一个水分子或另一个氨基酸）相连的。金属药物机理研究和新药开发也是金属组学与生物无机化学研究的共同领域，并且近期内获得较多研究成果。

3.3 金 属 药 物

金属离子是生命体的基本组成部分，作为生物大分子的辅因子，在多种生理过程中起到有别于有机小分子的重要作用。金属离子也常应用于医药行业作为诊断和治疗试剂。顺铂及其他铂类药物在临床癌症治疗方面的成功应用极大程度上促进了无机药物化学领域的发展。然而，传统铂化学疗法往往伴随产生严重的副作用和药物抗性。因此对除铂以外的其他金属，如钌、镓、金、钛、锑、锡等金属药物的研究也逐渐发展起来，以期改进已有金属药物的药理性质，从而寻找到最佳治疗方案（图 3-2）。此外，三氧化二砷（ATO，Trisenox®）已成功应用于急性早幼粒细胞白血病（acute promyelocytic leukemia，APL）患者的治疗；金属铋和银的化合物表现出较强的抗菌活性，近几十年来被广泛用作抗菌

药物。金属离子通常具有多种氧化态和配位环境，该性质导致金属配合物的结构多样性。改变金属中心种类或配体结构可使金属药物表现出不同的抗癌或抗菌活性[11]。

Cisplatin　Carboplatin　Oxaliplatin

Nedaplatin(Japan)　Lobaplatin(China)　Heptaplatin(Korea)

Trisenox　De-Nol　Auranofin

图 3-2　经典金属药物的结构

然而，大部分金属化合物甚至包括一些已应用于临床治疗和诊断的金属药物的具体作用模式仍不明确。许多金属药物的应用会对患者产生严重的副作用，且副作用的机理尚不明确。因此，明确金属药物的具体作用机理，包括它们的生理过程（细胞吸收、分布、生物转化等），分子靶点以及作用通路等信息不仅有助于开发金属药物的全部治疗潜力，也为设计合成具有更高疗效的新型金属药物提供指导意义。

传统意义上，金属药物的作用机理常通过体外实验来阐明，通过研究药物与单个潜在靶点蛋白或其他生物大分子相互作用得到具体的实验数据。然而判断真正的靶点蛋白往往需要大量的研究，且此类方法并不能在蛋白质组层面上提供生物体系对于药物反应机理的整体信息。考虑到生物体系的内在复杂性，搭建金属药物研究的综合实验平台将有助于对金属药物的生物活性提供系统性的认识。在这种情况下，金属组学和金属蛋白质组学应运而生。该领域为金属药物研究提供了大量有效的实验工具，从而有助于对金属药物的作用机理进行整体全面的考量。金属组学和金属蛋白质组学在分析技术上的进展大大推进了金属药物机理的研究，包括对于靶点蛋白的识别鉴定以及对于药物作用通路的探寻。本节旨在介绍

利用金属组学和金属蛋白质组学的尖端技术研究金属抗癌和抗菌药物作用机理的最新进展，重点介绍金属药物在（单）细胞层面上的生理反应，鉴定潜在药物靶点蛋白以及探索金属药物作用通路等方面的研究。

3.3.1　金属组学及金属蛋白质组学研究揭示金属药物作用机理

监测金属药物在细胞内的行为对评估药效和药物耐受性起到重要作用，其中包括检测药物在细胞内的含量、分布、生物转化、代谢及与其他必需元素的干扰关系。由于大部分金属药物倾向于与细胞内生物大分子结合并产生多种活性代谢产物，揭示金属药物的具体作用机理不仅需要明确鉴定出潜在的药物结合靶点，更需要阐明药物靶点与各类生物大分子之间的相互作用。近年来，蛋白质被认为是金属诊断或治疗药物的主要作用靶点，包括一些在生理或病理状态下起关键作用的金属酶以及细胞膜上的水通道蛋白等。虽然对于特定的金属药物，如铂类抗癌药物，核酸而非蛋白质为其主要作用靶点，但铂与蛋白质的相互作用在药物激活和细胞内传递过程中同样起到了重要作用。因此，对金属药物与蛋白质相互作用的研究有助于阐明药物的副作用及抗性产生机理，进而对设计合成新药提供帮助。

生物体系的内在复杂性给全面理解金属药物的药理性质及作用模式提出了难题。由于金属药物在细胞内倾向与多个蛋白靶点相结合，金属药物的作用模式较传统有机小分子药物的复杂度可能更高。尽管如此，近年来，金属组学和金属蛋白质组学的研究方法结合创新性的“系统生物学”视角，已被成功应用到系统性地表征金属药物产生的细胞效应，以期将来自不同实验源的复杂数据集进行整合评估。这一举措无疑将促进新型金属药物的设计合成和发展。

3.3.2　铂类抗癌药物

铂类药物是癌症化学疗法的重要药物。顺铂［Cisplatin，*cis*-diammine-dichloroplatinum(Ⅱ)，CDDP］作为第一个进入世界范围内临床研究的金属药物，对治疗一系列实体瘤具有很好的疗效。新一代的铂类抗癌药物如卡铂（Carboplatin）、奥沙利铂（Oxaliplatin）和奈达铂（Nedaplatin）等，对顺铂抗性癌细胞表现出很好的临床效果及较低的副作用，随后也批准进入临床使用。

顺铂及其类似物通过被动扩散及依靠人铜转运蛋白（hCTR1）主动运输两种途径进入细胞，并伴随一系列的细胞内水解和活化。Hambley 等利用同步辐射 X 射线衍射技术，研究了经顺铂处理的单个卵巢癌细胞中铂的原位分布情况；24h 后铂主要聚集在细胞核而非细胞质内，这与 DNA 为铂的主要靶点的认识相符。Lobinski 等利用互补的 ICP-MS 与 MALDI-MS 成像技术（图 3-3），研究了顺铂与奥沙利铂在人类肿瘤样品中的分布情况，实验结果表明奥沙利铂大部分聚集在

肿瘤组织的边缘，而顺铂能深入渗透到肿瘤内部，暗示了两种铂类药物的不同作用机理。同时这也是首例利用 ICP-MS 和 MALDI-MS 双重成像技术以互补的形式对肿瘤内的金属药物进行追踪，为金属组学研究方法在金属药物领域的应用提供了很好的思路[12]。

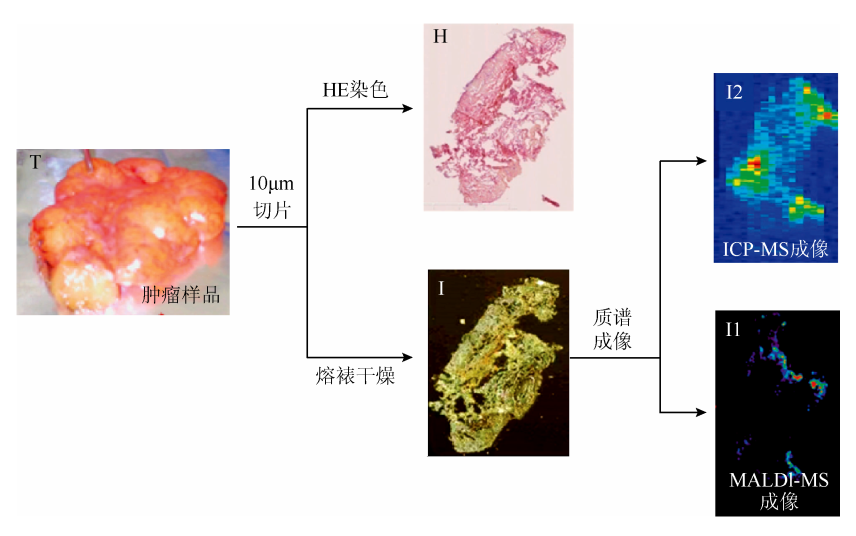


图 3-3　ICP-MS 和 MALDI-MS 对肿瘤切片的双重成像方案

Pt (Ⅳ)化合物较 Pt (Ⅱ) 化合物惰性更强且不易与生物大分子产生非特异性结合，为了寻找毒性更低的铂类药物，以 Pt (Ⅳ) 为金属中心的抗癌试剂的开发得到了广泛关注。Pt (Ⅳ) 化合物在细胞还原环境下会被还原成 Pt (Ⅱ) 活性物质。XANES 提供了 Pt (Ⅳ) 化合物在细胞内的还原情况。Pt (Ⅱ) 与 Pt (Ⅳ) 在 A2780 卵巢癌细胞中的比例可通过 XANES 谱图中两种物质的峰高比来直接确定；24h 后，所有 Pt (Ⅳ) 都被还原成 Pt (Ⅱ) 。然而，这种体内快速过早的 Pt (Ⅳ) 还原同时也降低了 Pt (Ⅳ) 类药物前体对癌细胞的选择性[13]。

尽管长期以来 DNA 被认为是顺铂的主要作用靶点，最近研究发现蛋白质/酶也在一定程度上参与了铂类化合物的药理过程。Coffey 等采用一维 SDS-PAGE 与 LA-ICP-MS 联用的技术，报道了第一个成功鉴定的大肠杆菌细胞提取液中的顺铂结合蛋白。强度最高的铂峰对应的蛋白条带经鉴定为外膜蛋白 A（outer membrane protein A，OmpA），其作用可能是作为离子通道促进顺铂的吸收。最近，Gómez-Gómez 等利用 LA-ICP-MS 技术，检测了顺铂在大鼠血清和肾小管上皮细胞（RPTECs）中的结合蛋白。若干铂结合蛋白在顺铂处理后的大鼠血清样品中被成功鉴定，包括转铁蛋白、血清白蛋白、α-2-巨球蛋白以及 $\alpha\beta$ 血红蛋白亚基等，这与报道的顺铂体外结合血清蛋白的结果相吻合。铂在 RPTECs 细胞中的主

要结合蛋白/酶包括核心组蛋白（H2A、H2B、H3、H4）、40S 和 60S 核糖体蛋白、苹果酸脱氢酶、3-磷酸甘油醛脱氢酶、烯醇酶等。铂与此类蛋白质结合很可能与顺铂诱导的细胞特异性肾毒性有关。

Baek 等对顺铂在大鼠肝细胞（PMH）内的作用机理进行了蛋白质组学和基因组学层面上的综合研究，成功鉴定了 19 种顺铂作用通路，其中包括一些已知的药物作用通路，如氧化应激、药物代谢、脂肪酸代谢、糖酵解和三羧酸循环；还包括一些新鉴定出的通路，如尿素循环、炎症代谢等通路，为深入理解顺铂诱导的肝细胞毒性提供了全新的依据（图 3-4）。药物抗性作为癌症治疗中的一大障碍，通常在临床治疗进行到一定阶段时产生。为此，研究者对铂敏感和铂抗性细胞进行了大量比较蛋白质组学和比较基因组学的分析，为阐明抗性产生机理提供了详尽的信息。癌症干细胞被认为与癌症的复发和药物的抗性产生有极大关联。通过比较蛋白质组学对患者体内分离的癌症干细胞和其分化产生的同基因后代细胞进行分析，发现一种在癌症干细胞中显著表达的蛋白 BIRC6。该蛋白质作为细胞凋亡的抑制蛋白之一，在药物的化学抗性产生方面可能起到关键作用。通过对癌症干细胞中表达量上调的蛋白质进行生物网络分析，鉴定出其主要功能簇分别参与氧化还原、DNA 复制、RNA 剪接、转录调控和翻译起始五类生物进程。敲除 BIRC6 基因可使细胞恢复对顺铂化学治疗的敏感性，表明 BIRC6 可作为潜在的治疗靶点使结肠癌干细胞得到根除[14]。

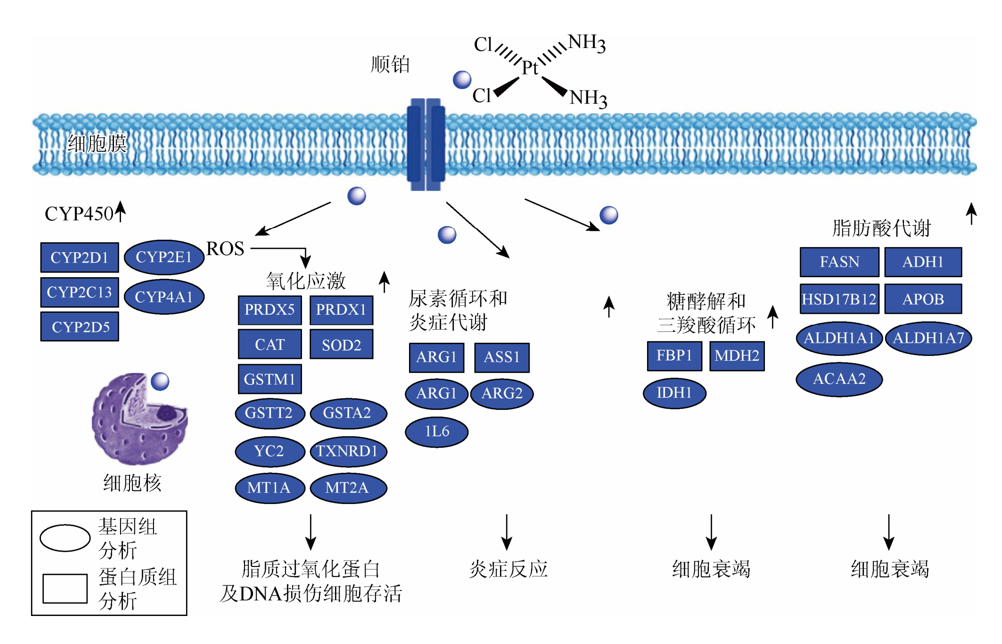


图 3-4　顺铂在大鼠肝细胞内的作用通路示意图

3.3.3　钌类抗癌试剂

钌化合物是铂类药物的最佳替代物，其优势在于对正常细胞的毒性较小，易于被肿瘤组织吸收，并且对固体转移瘤具有较高的选择性。目前有两类 Ru(Ⅱ)化合物（NAMI-A 和 KP1019），作为抗癌药物已进入临床试验阶段。尽管近期报道 NAMI-A 临床试验失败，但最新研究表明其对白血病细胞表现出较好的抑制活性，其设计合成含有不同种类配体的钌化合物作为抗肿瘤试剂也受到了广泛关注，如多吡啶、芳烃和络合氨等配体。钌化合物通过转铁蛋白通路被运送到肿瘤细胞内，而肿瘤细胞内的转铁蛋白受体表达量通常较高。Ru(Ⅲ) 在胞内还原环境中被还原为 Ru(Ⅱ)，与肿瘤细胞 DNA 发生作用进而诱导细胞凋亡。

Harris 等首次通过 SRXRF 成像技术揭示了 KP1019 和 NAMI-A 在单个成神经瘤细胞中的分布情况。经 KP1019 处理的细胞表现出钌与铁在细胞质和细胞核内的共分布；而经 NAMI-A 处理的细胞内无法观察到钌分布，与其公认的细胞膜结合作用机理相吻合。经含碘化吲唑基团的 KP1019 类似物处理后的 A549 细胞，表现出钌与碘的共分布，表明该化合物经过一系列生物相互作用，仍能保留完整的 Ru—N 结合键。利用 XAS 技术对 NAMI-A 和 KP1019 生物转化的比较研究表明，KP1019 相对于 NAMI-A 有更高的细胞毒性很可能源于其较慢的细胞外分解速度，从而使其具有较高的细胞吸收。

值得注意的是，钌化合物表现出不同于铂类化合物的药物代谢动力学行为。Dyson 等利用一维/二维凝胶与 LA-ICP-MS 联用技术，比较分析了 NAMI-A 和顺铂在无白蛋白的血浆样品中的蛋白质结合情况。结果表明，两类药物基本与相同的蛋白质结合，包括人血清白蛋白前体、人转铁蛋白前体和巨球蛋白 $\alpha2$ 等。然而，由于 NAMI-A 与蛋白质结合的可逆性，蛋白质中钌含量较铂含量低约五倍，这也揭示了 NAMI-A 具有低细胞毒性的原因。Lin 等利用二维凝胶比较蛋白质组学的方法，研究了两类钌化合物 NAMI-A 和 RAPTA-T 在人卵巢癌细胞 A2780 中的作用模式。结果表明，钌化合物诱导的蛋白质组变化与报道的铂化合物诱导蛋白具有较大程度的不同，说明了两类金属化合物具有完全不同的作用模式。

3.3.4　砷类药物

砷作为类金属，是一种性质介于金属与非金属之间的元素。它既是常见的致癌物，同时又作为一类化学治疗试剂得到广泛的应用。三氧化二砷作为最常见的无机砷化合物之一，已被成功用于急性早幼粒细胞白血病的临床治疗。砷化合物的毒性可能通过砷与蛋白巯基的相互作用产生。

SRXRF 对亚砷酸盐或砷酸盐处理后的单个 HepG2 细胞成像分析表明，砷主要聚集在细胞核内，可能与 DNA 或参与 DNA 转录的蛋白质结合。XANES 和

EXAFS 分析表明，砷-半胱氨酸［$As(Cys)_3$］为砷在细胞内的主要结合模式，表明砷倾向与富含半胱氨酸的蛋白质结合。砷与蛋白质结合可能对其在体内的代谢和蛋白质调控功能起到重要作用。早幼粒细胞白血病-维甲酸受体 α（promyelocytic leukemia/retinoic acid receptor α，PML-PARα）融合蛋白的表达是急性早幼粒细胞白血病（acute promyelocytic leukemia，APL）的主要特征，在 APL 的发生、发展及治疗过程中起关键作用。三氧化二砷被证明直接与 PML-PARα 融合蛋白锌指结构中的半胱氨酸结合，诱导 PML 蛋白聚合，从而促进其泛素化修饰及降解[15]。此外，亲和层析柱、砷荧光探针和生物素化的砷拉下技术等方法已成功用于探测细胞环境中的砷结合蛋白。Mayer 等利用双砷荧光探针 FlAsH 在蛋白质组层面对 *S. oneidensis* 和 *E. coli* 细胞内源表达的四半胱氨酸序列进行分析，成功鉴定出金属伴侣蛋白 SlyD（图 3-5）。该蛋白质作为氢化酶生物合成通路中的重要蛋白质，在两类细菌的表达中均含有四半胱氨酸序列（*So*SlyD 含 CCX_9CC 序列；*Ec*SlyD 含 $CCX_{15}CC$ 序列）。

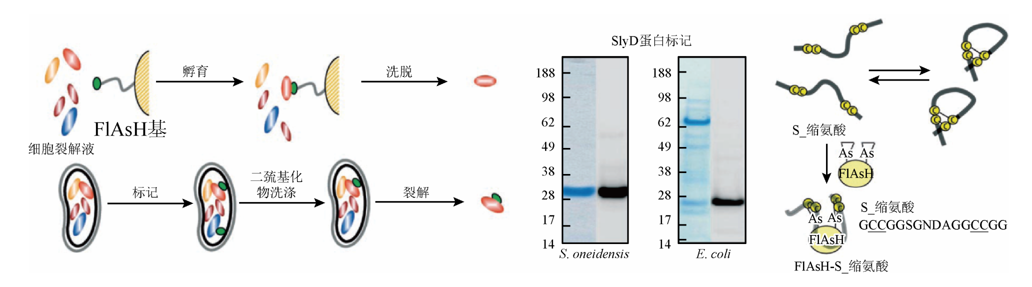


图 3-5　利用砷荧光探针鉴定细菌细胞内含有四半胱氨酸序列的蛋白质

半胱氨酸被认为在砷与蛋白质的结合中起了主要作用。乐晓春等利用砷亲和色谱柱在人肺癌细胞 A549 中进行靶向蛋白质组学分析，成功分离鉴定出几十个新的潜在砷靶点蛋白，其中包括 50 个核蛋白及 24 个膜/细胞器组分蛋白。这些蛋白质具有重要的生物功能，参与 DNA 修复、细胞氧化还原调节及细胞凋亡等进程[16]。Huang 等借助 PAO（*p*-aminophenylarsine oxide）琼脂糖基质，系统性地鉴定并比较了砷敏感（CHOA）和砷抗性（SA7）两类大鼠卵巢细胞系中的砷结合蛋白。砷在两类细胞中的结合蛋白基本一致，约 20 个砷结合蛋白在两类细胞中表现出表达量差异。通过选取不同半胱氨酸含量的砷结合蛋白做进一步体外实验验证，发现蛋白质与砷的结合能力并不完全取决于蛋白质中半胱氨酸残基的数目。

3.3.5　铋类抗菌药物

与同族元素砷和锑相比，铋对人体几乎无毒性。铋化合物作为药物已有上百年的历史。胶体枸橼酸铋（colloidal bismuth subcitrate，CBS，丽珠得乐®）和雷尼替丁

枸橼酸铋（ranitidine bismuth citrate，RBC，Tritec®或 Pylorid®）在临床上常与抗生素联用，用于治疗幽门螺杆菌（*Helicobacter pylori*，*H. pylori*）感染。铋（Bi）在水溶液中易水解（pK_{a1}～1.5），与硫和氧元素有较强的结合能力。Bi(III) 的配位数通常为 3～10，呈现出不规则的配位几何构型。

利用时间分辨电感耦合等离子体质谱（time-resolved ICP-MS）可追踪 CBS 在单个幽门螺杆菌细胞内的摄取情况。经药物处理的单个完整细菌细胞直接泵入 ICP-MS 进行金属分析，产生的金属信号尖峰强度与细胞内该金属含量成正比［图 3-6（a）］。以氧化镁（MgO）纳米颗粒为校对标准物，在 *H. pylori* 对照组中检测到每个细菌细胞约含 2.9×10^{7} 个镁原子；经 CBS 处理后的 *H. pylori* 对金属的吸收约为每细胞 1.0×10^{6} 个铋原子，细菌表现出时间和剂量依赖的药物摄取过程。^{209}Bi 的尖峰信号呈现出的强度差异表明了细胞的异质性；处于不同生长周期的细胞表现出不同的药物吸收反应。同时在单细胞水平上观测到铁元素对铋吸收的干扰，表明两类元素的运输通路之间存在一定的竞争［图 3-6（b）］[17]。

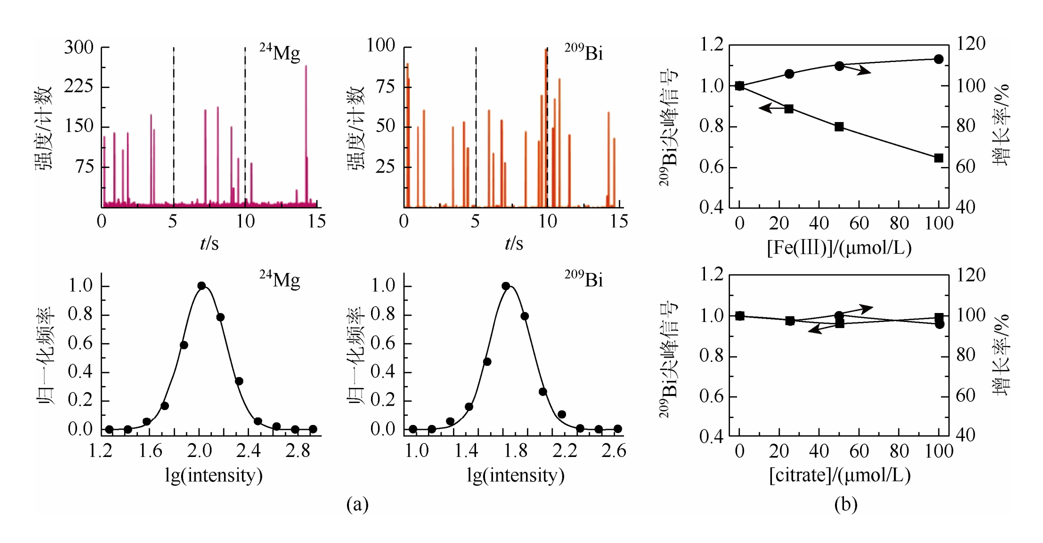


图 3-6　在单细胞层面监测幽门螺杆菌对铋类药物的摄取情况。（a）定量检测镁与铋在单个幽门螺杆菌细胞中的含量；（b）铁与铋元素在单个幽门螺杆菌细胞内的竞争性吸收

近年来，抗生素滥用导致的抗性问题成为了医药界的一大难题。然而，尽管铋类抑菌剂已有近几十年的临床应用历史，至今仍未见幽门螺杆菌对此类金属药物产生抗性的报道。大量的实验表明，金属铋主要通过与细菌内多种蛋白质和酶的结合来发挥药效，而这种多靶点结合的性质也是金属药物的共性。本课题组利用金属组学和金属蛋白质组学的方法，系统地分析了铋在幽门螺杆菌内的结合蛋白。利用 Bi-IMAC 与 2D-GE、MALDI-TOF-MS 联用技术，成功鉴定了七种

铋结合蛋白［图 3-7（a）］，包括热激蛋白 HspA 和 HspB、氧硫还原蛋白 TsaA、中性粒细胞激活蛋白 NapA、延胡索酸酶 Fumarase、脲酶亚基 UreB 以及延长因子 Ef-Tu。这表明金属铋药物潜在影响幽门螺杆菌的代谢及翻译进程。利用一维 SDS-PAGE 与 LA-ICP-MS 联用技术，可直接观测到与细菌蛋白结合的铋信号［图 3-7（b）］。根据蛋白质分子质量的性质以及文献报道，七种蛋白质可暂时归属到 SDS-PAGE 中相应的铋结合条带，包括 UreA，UreB，NapA，*S*-腺苷甲硫氨酸合成酶 MetK，果糖-二磷酸醛缩酶 Fba，细胞周质 Fe(III)ABC 转运蛋白 CeuE 以及 30S 核糖体蛋白 RpsF。然而金属结合蛋白的明确归属则需要通过分辨率更高的蛋白质分离技术及质谱分析手段做进一步的鉴定。

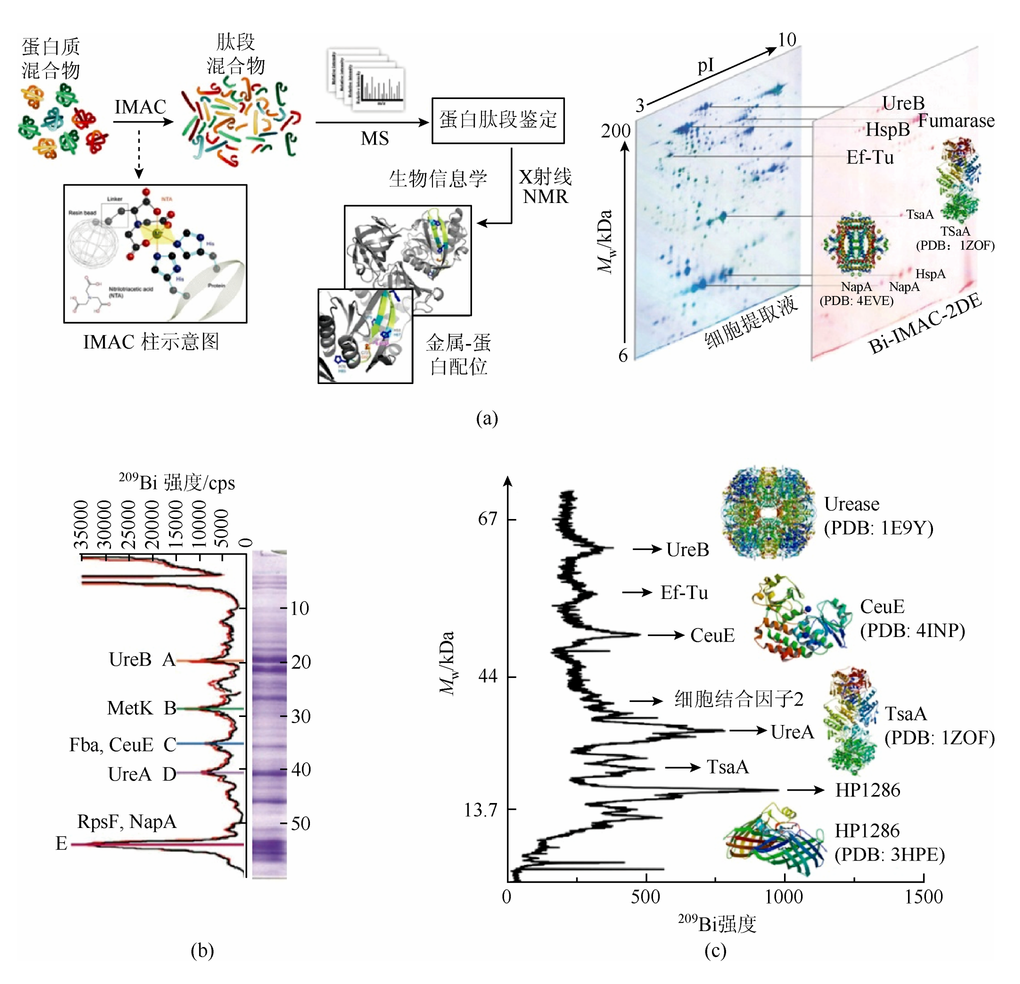


图 3-7　鉴定幽门螺杆菌细胞内铋结合蛋白的综合研究方法。（a）Bi-IMAC 与二维凝胶分离技术联用鉴定铋在 *H. pylori* 11637 中的结合蛋白；（b）一维/二维凝胶分离与 LA-ICP-MS 技术联用分析铋在 *H. pylori* 26695 中的结合蛋白；（c）GE-ICP-MS 分析铋在 *H. pylori* 26695 中的结合蛋白

通过连续流动凝胶电泳与 ICP-MS 联用系统（GE-ICP-MS）可成功实现蛋白质与其在细胞内结合金属的同时检测。ICP-MS 监测电泳流出的蛋白结合金属峰，可反过来收集对应于主要金属峰的蛋白质组分，进而通过 MALDI-TOF-MS 等质谱技术对蛋白质进行鉴定。利用该系统，明确鉴定了七种铋结合蛋白[图 3-7（c）]，包括 UreA、UreB、TsaA、CeuE、Ef-Tu 以及两种新鉴定出的铋结合蛋白 HP1286 和细胞结合因子 2，两种蛋白质分别参与细胞内类异戊二烯醌代谢和蛋白脯氨酸残基的顺反异构修饰进程。通过 GE-ICP-MS 观察到的金属铋与幽门螺杆菌蛋白结合的谱图，证实了铋在细菌内与多蛋白靶点相结合的作用机理。该技术可以方便地应用到其他生物体系中，找出细胞内金属所结合的蛋白质，以了解更多生物金属的功能及金属药物作用机理[18]。

3.4　结论与展望

金属组学和金属蛋白质组学结合生物化学及分子生物学研究方法的综合应用，为阐明金属药物作用机理提供了更深入的依据。金属蛋白质组学从系统生物学的角度，可实现在分子水平上全面揭示金属药物发挥作用、产生毒性及使细胞产生抗性的机理。此类研究结果与临床数据相结合，将在极大程度上推进低毒性、高疗效金属药物的研发。如前所述，许多分析方法和工具已在金属组学和金属蛋白质组学领域得以成功应用，每一种都有其优缺点。而金属组学和金属蛋白质组学领域目前面临的首要问题是如何在分离和分析过程中保留样品在原位状态或生理条件下的完整信息；另一方面，研究者应会分析个别方法输出的信息缺陷，如用 IMAC 技术找出的金属结合蛋白/肽段在生理条件下可能并不具备金属结合的能力。因此，对现有金属组学和金属蛋白质组学领域分析方法的改进仍需进行不断的尝试，并应继续向该领域引入创新性的技术，以期建立一体化的金属生物学综合分析平台。

（王海波　王宇传　孙红哲）

参 考 文 献

[1] Waldron K J，Robinson N J. How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal？Nat Rev Microbiol，2009，7（1）：25-35.

[2] Frausto da Silva J J R，Williams R J P. The Biological Chemistry of the Elements：The Inorganic Chemistry of Life 2nd ed. Oxford：Oxford University Press，2001.

[3] Haraguchi H. Metallomics as integrated biometal science. J Anal At Spectrom，2004，19（1）：5-14.

[4] Sun H，Chai Z F. Metallomics：An integrated science for metals in biology and medicine. Ann Rep Sec“A”Inorg Chem，2010，106：20-38.

[5] Sun X，Tsang C N，Sun H. Identification and characterization of metallodrug binding proteins by（metallo）proteomics. Metallomics，2009，1（1）：25-31.

[6] Mounicou S，Szpunar J，Lobinski R. Metallomics：The concept and methodology. Chem Soc Rev，2009，38（4）：1119-1138.

[7] Dernovics M，Lobinski R. Speciation analysis of selenium metabolites in yeast-based food supplements by ICPMS-assisted hydrophilic interaction hplc-hybrid linear ion trap/orbitrap MS^n. Anal Chem，2008，80（11）：3975-3984.

[8] Lahner B，Gong J，Mahmoudian，M et al. Genomic scale profiling of nutrient and trace elements in *Arabidopsis thaliana*. Nat Biotechnol，2003，21（10）：1215-1221.

[9] Wang Y，Wang H，Li H，et al. Metallomic and metalloproteomic strategies in elucidating the molecular mechanisms of metallodrugs. Dalton Trans，2015，44（2）；437-447.

[10] Bendall S C，Simonds E F，Qiu P，et al. Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum. Science，2011，332（6030）：687-696.

[11] Mjos K D，Orvig C. Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry. Chem Rev，2014，114（8）：4540-4563.

[12] Bianga J，Bouslimani A，Bec N，et al. Complementarity of MALDI and LA ICP mass spectrometry for platinum anticancer imaging in human tumor. Metallomics，2014，6（8）：1382-1386.

[13] Hall M D，Foran G J，Zhang M，et al. XANES determination of the platinum oxidation state distribution in cancer cells treated with platinum(Ⅳ) anticancer agents. J Am Chem Soc，2003，125（25）：7524-7525.

[14] Levina A，Aitken J B，Gwee Y Y，et al. Biotransformations of anticancer ruthenium(Ⅲ) complexes：An X-ray absorption spectroscopic study. Chem Eur J，2013，19（11）：3609-3619.

[15] Zhang X W，Yan X J，Zhou Z R，et al. Arsenic trioxide controls the fate of the PML-RAR alphaoncoprotein by directly binding PML. Science，2010，328（5975）：240-243.

[16] Shen S，Li X F，Cullen W R，et al. Arsenic binding to proteins. Chem Rev，2013，113（10）：7769-7792.

[17] Tsang C N，Ho K S，Sun H，et al. Tracking bismuth antiulcer drug uptake in single *Helicobacter pylori* cells. J Am Chem Soc，2011，133（19）：7355-7357.

[18] Hu L，Cheng T，He B，et al. Identification of metal-associated proteins in cells by using continuous-flow gel electrophoresis and inductively coupled plasma mass spectrometry. Angew Chem Int Ed，2013，52（18）：4916-4920.

第 4 章　环境金属组学

4.1　环境科学中金属研究与环境金属组学研究范畴

金属（包括准金属）类污染物是环境科学研究领域中极为重要的一类研究对象。目前，备受关注的金属污染物包括汞（Hg）、铅（Pb）、砷（As）、镉（Cd）、铬（Cr）、镍（Ni）等，这些金属或被国际癌症研究机构（IARC，包括砷、镉、六价铬、镍）[1]和美国国家环境保护局（U.S. EPA，包括包括砷和六价铬）[2]定义为一级致癌物质，或被世界卫生组织（WHO）列为引起重大公共卫生问题的十大化学品（汞、镉、铅和砷）[3]。这些金属主要来自地球圈，通过人类的工农业来活动进入人类生活圈，如矿石开采、金属冶炼、化石燃料使用等；或者是由地球的自然过程引入生物圈，如火山喷发、地壳风化、自然释放等。进入环境以后，这些金属污染物在环境中的迁移、转化，以及它们对于人类和其他生物造成的影响都与一系列的生物化学的过程密不可分[4-8]。这些过程不仅涉及发生在生物体内的过程，同时还包括一系列的生物或微生物介导的、发生在环境中的地球化学过程；而目前对于这些过程的认识还不全面。由于金属类污染物无法降解，因此一旦污染将会长期存在；同时金属污染即使在环境中处于较低水平，也可能在一定外部条件下，通过食物链进行生物累积、富集和放大，最终对食物链顶端的人类以及其他哺乳动物的健康造成危害[9-11]。

作为一门全新的学科，金属组学研究在认识上强调系统性，在方法上强调理论与实验相结合，在技术上强调利用最新的综合性技术手段。金属组学的研究有助于系统全面地解释与金属相关的过程与生命活动[12-15]。它和环境学科的交叉必然会促进我们在分子层面上更系统、更深入、更完整地理解环境中的金属类污染物与生态系统的相互作用及作用机制[16-20]。从金属组学发展的历史来看，金属组学的形成和发展与金属类污染物的健康效应研究有着必然的联系。从最早金属组学定义的创立，到对金属组学研究范围的初步界定和研究方法的系统阐述，及至随后 *Metallomics* 期刊的创刊都是如此；而且一直以来活跃于金属组学研究领域的学者，有相当部分都是或者曾经致力于环境领域金属方面研究，尤其是金属分析及金属形态分析等研究[14,21-24]。在最初给出的金属的定义中也将金属形态等概念包括在其中；目前，对于生物体内金属的赋存形态和价态的研究，以及它们的转化和由此而衍生的环境和健康方面的研究是环境中热点研究问题之一。与典型的金属组学主要针对细胞和组织内的金属组的研究范畴不同的是，环境金属组指的是在生物体内及其所处外环境中的典型的金属污染物，及生物体内受污染物影响和调控的金属元素包括一些生命必需元素。

环境金属组学就是利用综合性的技术手段，系统地研究这些金属在生物体内和所处外环境中的含量、分布、形态、传输和转化。依据环境研究的特点，环境金属组学的研究更突出所研究金属的外源性和外源调控属性。环境金属组不仅针对进入生物体内的金属，还关注生物介导的金属在地球圈之内的循环、金属进入生物体的过程以及在不同生物之间的传递[25]。由于本书其他章节已对金属组学方法学方面进行了专门综述和介绍，本章将不特别对方法方面进行单独讨论，而是以汞、砷等环境研究中受关注的典型金属污染物的研究为主线，循着从宏观到微观的顺序，分别对金属在地球圈与生物圈之间的互动、金属环境健康和金属毒理学等环境科学研究中涉及的金属组学方面的研究及其涉及的相关技术进行综述和展望。

4.2　地球圈与生物圈的互动

揭示环境中金属来源、存在状态以及变化是研究它们对环境和人类健康影响的基础。对生物体造成健康影响的金属均为非必需、外源性金属，这些金属都来自地壳。它们随着人类活动，尤其是工业活动如矿山开采、金属冶炼等，或者地球的自然过程（如火山喷发、岩石风化等），进入土壤、水体和大气，并经过一系列物理、化学和生物过程的传输、转化，最终被人和其他生物体吸收并造成对健康的影响。

生物体内的金属浓度与外环境中金属浓度是息息相关的。针对文献的统计数据表明人体血浆中元素（不包括碳、氢、氧、氮）的浓度在总体上与海水中元素的浓度呈明显的正相关性[14]。如图 4-1 所示，总体上而言，在海水中含量最高的 Na、K、Ca、Mg 等元素在人体血浆中也是浓度最高的元素；海水中含量最低的

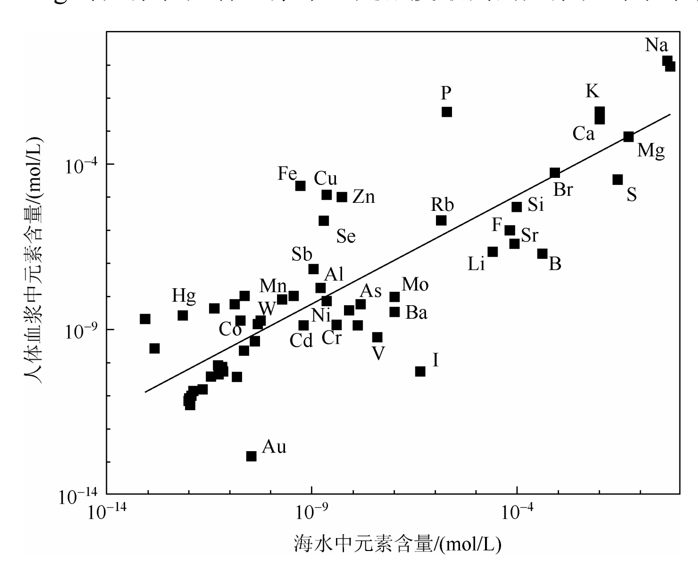


图 4-1　人体血浆中元素与海水中元素的关系图[14]

镧系元素，在血浆中检出的浓度也是最低的。同时，无论是人体所需要的维持健康的必需元素还是非必需元素，都符合这一正相关的规律。在地球进化的大时间尺度下这一外环境浓度决定生物体内金属浓度的规律更为明显[26-28]。例如，利用系统基因学的方法针对细菌金属的蛋白质结合域的研究表明，外环境中金属的生物可给性会影响生物体对于金属的选择，以及促进进一步的生物体在相关功能上的进化[29]。因此，从宏观的意义上来讲，金属污染物对人体和其他生物最终造成健康影响的程度是由环境中这些金属的浓度所决定的。

在金属涉及的一系列环境过程中，微生物可以通过改变金属的价态（如氧化和还原）和形态（如甲基化和去甲基化）改变金属的化学行为和生物效应，进而影响金属在环境中的迁移、转化、生物可给性以及在生物体内循环和累积的过程[30-34]。例如，在厌氧条件下，砷酸盐异化还原菌（dissimilatory arsenate respiring prokaryote）可以利用三价砷[As(V)]作为氧化呼吸的电子受体，将五价砷还原成五价砷[As(III)]，并在还原过程中获得能量[35]。在天然水体近中性的 pH 条件下，三价砷在土壤表面的吸附能力小于五价砷，因此这一细菌介导的砷的还原过程会极大地增加砷从土壤向水体的释放，而导致水体中砷的浓度增加[5, 9]。对于南亚地区饮用水中严重的砷污染来源的研究发现，正是这一个过程在其中起到了非常重要的作用[36-38]。

对于汞的健康问题中备受关注的甲基化的形态——甲基汞，也主要是由厌氧性细菌（如 sulfate-reducing bacteria）介导由无机汞产生的（图 4-2）。但是这一生物甲基化的分子机理却因细菌种属不同而有明显差异。如脱硫杆菌（*Desulfobacteriaceae* spp.）通过乙酰辅酶 A 把甲基转移给离子态汞，生成甲基汞[39]；而脱硫弧菌（*Desulfovibrionaceae* spp.）介导的汞的生物甲基化过程的机理则有所不同[40, 41]，尽管目前

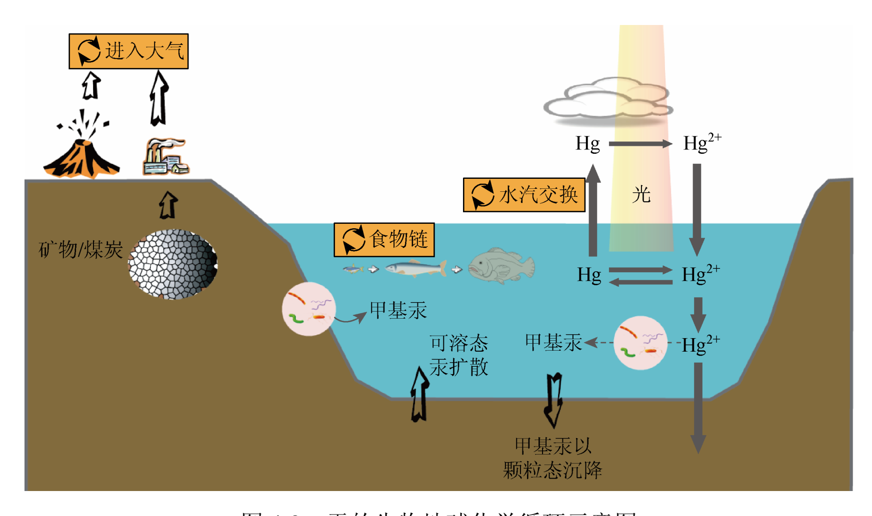


图 4-2　汞的生物地球化学循环示意图

具体的分子机理仍然未完全知晓，但最近研究表明这一过程与 HgcA 和 HgcB 这两个分别负责甲基转移和电子供体的蛋白质密切相关[42]。

金属类污染物被生物体吸收后，由于无法代谢，会在生物体内累积；同时会随着食物链传递，在高营养级的生物体内累积量远高于环境中的金属浓度（图 4-2）[43-46]。例如，针对南佛罗里达地区的研究表明，环境水体中的汞的浓度约在 0.1ng/L 水平，在典型水生生物食物链中，汞的浓度在浮游植物、浮游动物、食草性鱼类、食肉性鱼类体内的浓度随着营养级的升高急剧上升，在大口鳟鱼体内的生物放大因子甚至高达 10^7 一千万倍[47]。针对陆生食物链的研究也显示了类似的生物累积效应。再如，对于广东韶关大宝山矿区的研究发现，在土壤→大米→鸡的食物链中，铅和镉的含量也呈现明显的生物累积效应[48]。通过生物的累积和放大效应，环境中处于安全标准以下的金属污染也可能最终导致潜在的健康问题。

4.3　金属环境健康研究

发现环境来源的金属的暴露与健康之间的关联性以及它们进入生物体的途径是金属环境健康研究的关键一步。金属从环境中通过各种途径，进入人体及其他生物体内后，当累积达到一定量，就会对健康造成明显的影响。总体上而言，金属的生物效应属于典型的剂量-效应关系，符合贝特朗法则（Bertrand’s rule）（图 4-3）[49]。与生理必需元素和金属药物在生物体内的浓度存在最佳的健康效应区域不同，金属污染物没有有益效应，毒害作用会随着浓度的增加而持续增加。

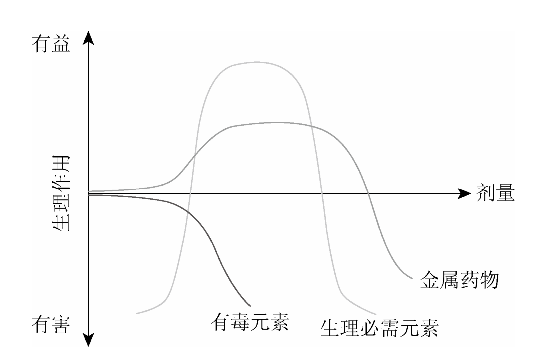


图 4-3　有毒金属元素、生理必需微量元素和金属药物对于人体健康的剂量-效应关系

发生在 20 世纪 50 年代日本水俣湾的水俣病事件是一件非常典型的点源工业污染造成的严重的健康事故。事故的原因是含汞的工业废水被随意排放到水俣湾水域，并在鱼类和贝类等水生生物中富集，附近居民食用后造成汞中毒[50]。而备受关注的孟加拉地区饮用水砷污染问题则是典型的自然来源的污染造成的大范围

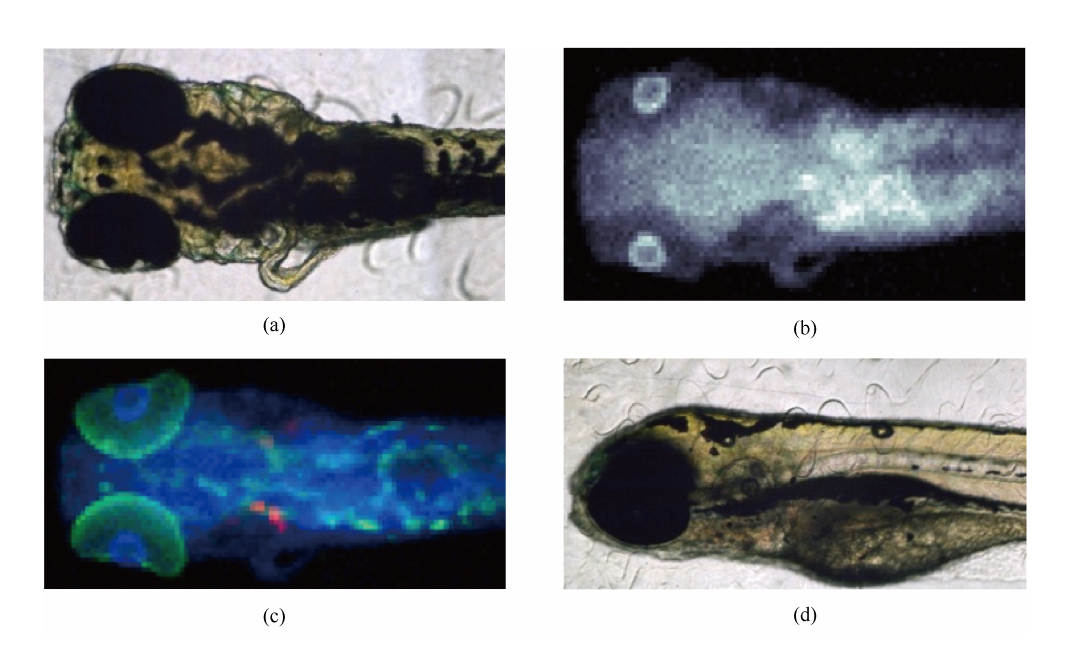
的环境健康问题[36-38]。该地区饮用水中砷含量甚至可以超过 800μg/L，远大于世界卫生组织规定的 10μg/L 的标准。依照世界卫生组织的标准，大约有 3500 万～7700 万人口受到饮用水砷污染的威胁[51]。针对该地区的研究表明，饮用水砷污染与死亡率存在明显的相关性[52，53]。

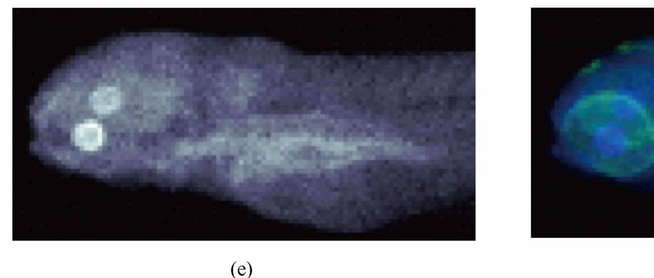
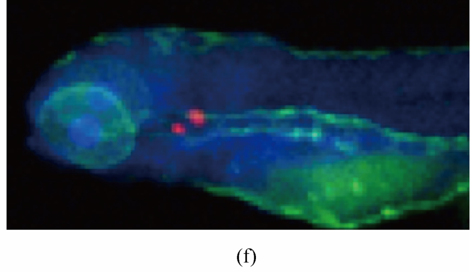
与上述比较显著的重金属健康问题相比，一些长周期、低剂量的环境暴露的环境健康问题，尽管目前无法得到确凿的结论，但是潜在健康风险同样值得关注。例如，针对一千多篇的文献整理和分析发现，无机汞可能作为一种在阿尔茨海默病的形成过程中起到辅助作用的环境因素，相关的证据包括：流行病学结果——无机汞的暴露与记忆缺陷存在显著的正相关性；解剖学研究结果——阿尔茨海默病患者脑部的汞含量呈现上升趋势；活体模型侧面支持了这种关联的可能性[54]。针对砷的人体健康的研究也表明，长期摄入无机砷可能会导致发育影响、神经毒性、糖尿病和心血管疾病等健康危害[55]。

除了暴露引起的直接健康效应，母体暴露导致的后代潜在的健康风险是值得担心的另一个问题。有流行病学的研究发现，母体血液中汞含量与新生儿的出生体重和身高呈明显的负相关性[56]，母体血液中汞含量偏高会导致婴儿出生后的生长减缓[57]。

4.4　金属的环境毒理学研究

金属进入生物体以后，鉴别它们在组织、细胞甚至亚细胞器内的分布和形态是研究金属在生物体内传输和毒性机理的第一步。金属/金属蛋白的原位鉴定可以

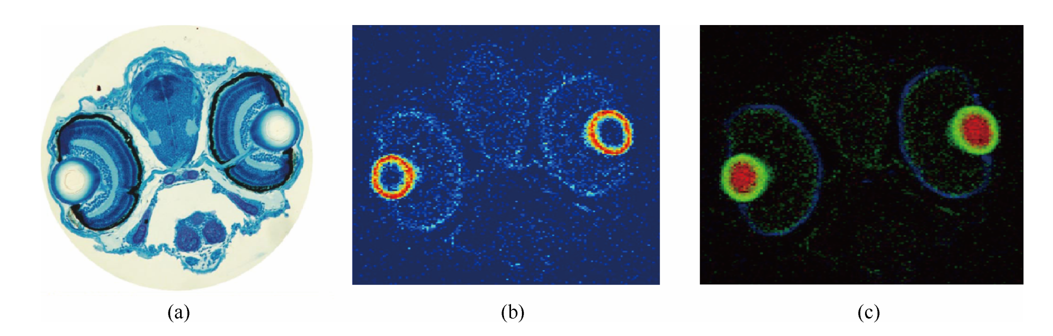


(e)　　(f)

图 4-4　利用 X 射线荧光光谱检测 MeHg-L-cysteine 暴露后的斑马鱼体内金属的分布。（a，d）是鱼体光学成像的图片，分别是正面和侧面；（b，e）是汞在斑马鱼体内的分布；（c，f）是汞与其他金属分布叠加后的图像［Copyright（2008），National Academy of Sciences，USA］

为这一研究提供最直观的信息[58]。例如，利用同步辐射 X 射线荧光光谱技术研究甲基汞的化合物（MeHg-L-cysteine）暴露后，汞在斑马鱼体内分布的研究，可以直观地提供微米空间分辨率层面上的分布信息[59]。如图 4-4 所示，汞在斑马鱼体内的分布并不是均一的，主要集中在脑、消化道以及眼部。高分辨的眼部切片扫描结果进一步揭示汞特异性地结合在斑马鱼眼球外部上皮组织的一层单细胞层上。元素分布显示，这一单细胞层里同时还含有高含量的硫元素，却没有发现锌元素有显著性富集（图 4-5）[59]。汞在斑马鱼眼部的高富集可能说明了由汞暴露导致的失明可能是由于汞针对眼睛的直接作用，而不是由于汞的神经毒性而产生的间接作用。金属的成像结果可以为后续的毒理学研究提供优先考虑的目标。目前的 X 射线荧光光谱技术不仅可以提供二维的平面扫描结果，还可以进行三维的成像研究，空间分辨率可以达到 400nm 的水平[60]，水平的分辨率甚至可以高达几十纳米的水平[61]。同时，可以针对多种元素进行成像，不仅包括金属和准金属元素，也包括一些非金属元素。



(a)　　(b)　　(c)

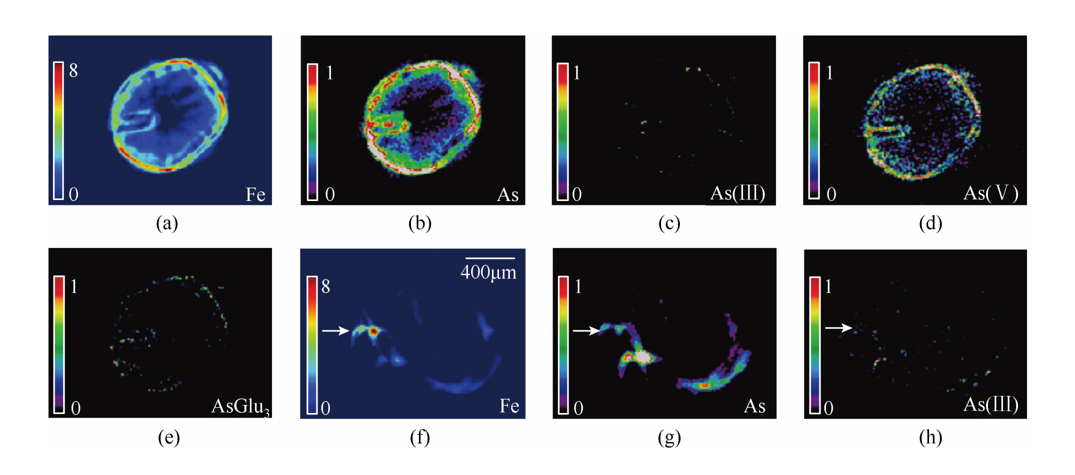
图 4-5　MeHg-L-cysteine 暴露后的斑马鱼头部金属的高清晰分布图。（a）是组织染色图；（b）是汞的分布图，分辨率 2.5μm；（c）汞与其他元素叠加后分布图［Copyright（2008），National Academy of Sciences，USA］

相比较于利用同步辐射荧光成像技术，小分子探针技术可以针对活体开展实

时成像研究。例如，基于荧光染料罗丹明改进的特异性识别汞离子的小分子荧光探针（图 4-6），不仅可以对细胞进行活体成像，而且可以对鱼体进行整体或者脏器成像研究[62，63]。利用探针的研究发现，斑马鱼脏器在高浓度汞的暴露条件下，在 20～30min 内会吸收饱和，这一结果与之前利用放射性同位素的研究结果一致。除了特异性针对汞离子的探针，目前开发出来的还有针对铅离子、镉离子、镍离子等污染类金属的探针[64]。

图 4-6　汞离子选择性探针[62]。汞离子会促使氨基硫脲基团的成环，因此探针一旦识别汞离子后，会把左边没有荧光的探针转变成发红色荧光的形态

除上述提到的两项技术之外，其他的原位成像技术还包括激光烧蚀-电感耦合等离子体质谱（laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry，LA-ICP-MS）技术[65-67]、二次离子质谱成像技术（second ion mass spectrometry，SIMS）[68，69]、拉曼光谱成像技术、同位素成像技术以及组织染色技术等[58]。除了进行元素鉴定以外，一些原位成像技术还可以用以进一步分析元素的化学形态和氧化还原价态。例如，利用 X 射线荧光光谱技术研究砷在水稻根部吸收状况（图 4-7）[58，70]。水稻根部不同形态的砷，包括三价砷［As(III)］、五价砷［As(V)］和 $As(GS)_3$（arsenic triglutathione）都可被清晰地鉴定出来。



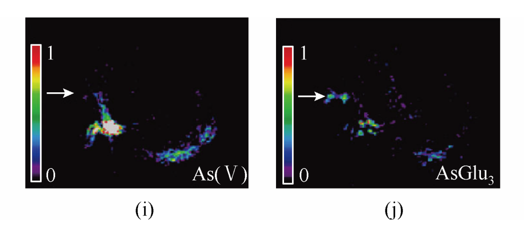


图 4-7　利用 X 射线荧光光谱监测的水稻根部剖面上铁、砷、三价砷、五价砷和 $As(GS)_3$ 的分布[70]［Copyright（2010），American Chemical Society］

在蛋白质组的层面上全面地分析金属结合蛋白，是完整地解释金属在生物体内传输及健康风险的毒理学分子机理的基础，但是目前在技术上实现金属蛋白的全局性分析还具有很大挑战性[71，72]。与整个金属组学方法学研究的情况一致，借鉴蛋白质组学的方法依然是关于这方面研究的重要策略[22，23]。这些技术特点是高分辨的分离技术，如液相色谱和电泳技术等，与高灵敏的检测技术，如质谱、光谱技术等的结合。例如，利用二维液相色谱-电感耦合等离子体质谱技术（图 4-8）分离鉴定人体血液中汞主要结合的蛋白质的研究，第一次鉴定了健康人体血液中汞结合在人血浆白蛋白上[73]。

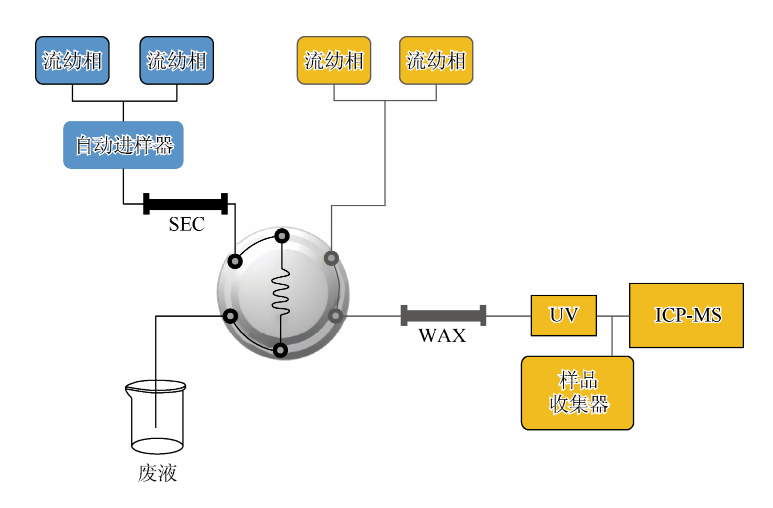


图 4-8　2D-HPLC-UV-ICPMS 金属蛋白分离系统示意图。两维液相色谱分离系统的第一维是体积排阻柱（SEC），第二维是离子交换柱（WAX）。分离后的样品首先通过紫外检测器检测蛋白质的信号，然后进入电感耦合等离子体质谱检测金属信号

目前，只有非常有限的工作实现了金属蛋白全面分析。例如，针对激烈火球菌（*Pyrococcus furiosus*）、大肠杆菌（*Escherichia coli*）和硫磺矿硫化叶菌（*Sulfolobus solfataricus*）的金属蛋白质组的分析，发现了大量之前从未报道过的金属结合蛋

白，包括针对特定蛋白的结合金属和针对特定金属的结合蛋白[74]。目前，大部分工作主要集中于鉴定未知的特定金属的结合蛋白，或针对特定蛋白的金属结合谱的研究；也有部分针对特定金属的探究毒性机理的研究[75-78]。Wang 等针对汞暴露的大鼠的研究发现，母鼠的脑细胞细胞质中比其后代含有更高含量的汞和汞结合蛋白[79]。对于三文鱼鱼卵中的汞结合蛋白的研究发现了多个汞结合蛋白，它们的分子质量为 12 000～300 000Da[80]。进一步的多元素分析发现，相应的汞结合蛋白的色谱峰往往含有高含量的硒和硫元素；这一结果说明了汞可能是通过硒代半胱氨酸和半胱氨酸的残基与蛋白质结合的。对于金属蛋白定量研究方面，柱后同位素稀释提供一种方便可靠的定量方法[81，82]。本书第 2 章对该方法进行了介绍。

4.5　结论与展望

尽管金属组学的产生与环境研究领域有非常深的渊源，但是目前除了之前固有的部分分析技术和研究领域的延续传承外，真正以金属组学的方式开展金属在环境与健康方面的研究依然非常稀少。这里有目前金属组学方法学平台不完善的因素，另外，环境的研究和金属组学的研究的交叉也需要进一步增进和加强。一些研究方向都亟需我们利用金属组学的研究思路，结合多学科的研究手段去完成：汞的生物甲基化的分子机理的问题；低剂量、长周期典型金属污染物（如汞和砷）的暴露与人体健康之间关系的研究；金属纳米材料的健康效应以及它与其他污染物联合毒性效应研究；污染物调控生物体内金属代谢的研究；典型金属污染物在人体和生物体内的直接作用的蛋白质谱和致毒作用的关键通路；等等。针对特定金属的环境与健康的问题，以金属组学的方法学开展完整的研究将不仅有助于两个学科的交叉融合，同时会促进各自学科向更深入的方向发展，而环境金属组学将成为金属组学研究的一个重要组成部分。

（胡立刚　何　滨　江桂斌）

参 考 文 献

[1] IARC. IARC Monographs on the evaluation of cacinogenic risks to humans. http://monographs.iarc. fr/index. php/（Sep 6，2015）.

[2] U.S.EPA. Integrated Risk Information System（IRIS）. http://www.epa.gov/iris/search_human.htm（Sep 6，2015）.

[3] WHO. 引起重大公共卫生关注的 10 种化学品. http://www.who.int/ipcs/assessment/public_health/chemicals_phc/zh/（Sep 6，2015）.

[4] Alloway B J，Trevors J T. Heavy Metals in Soils：Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability. 3rd ed. New York：Springer，2012.

[5] Hu L G，Cai Y. Biogeochemistry of arsenic. Prog Chem，2009，21（2-3）：458-466.

[6] O'Driscoll N J，Rencz A，Lean D R S. The biogeochemistry and fate of mercury in the environment. Biogeochem Cycles Elements，2005，43：221-238.

[7] Kim K H，Hanson P J，Barnett M O，et al. Biogeochemistry of mercury in the air-soil-plant system.//Sigel A，Sigel H. Metal Ions in Biological Systems，Vol 34：Mercury and Its Effects on Environment and Biology. New York：Marcel Dekker，1997：185-212.

[8] Bowell R J，Alpers C N，Jamieson H E，et al. The environmental geochemistry of arsenic—An overview. Rev Mineral Geochem Environmental Geochemistry，Mineralogy，and Microbiology，2015，79：1-16.

[9] Duker A A，Carranza E J M，Hale M. Arsenic geochemistry and health. Environ Int，2005，31（5）：631-641.

[10] Liu G，Cai Y，O'Driscoll N J. Environmental Chemistry and Toxicology of Mercury. New York：Wiley，2011.

[11] He B，Yun Z J，Shi J B，et al. Research progress of heavy metal pollution in China：Sources，analytical methods，status，and toxicity. Chin Sci Bull，2013，58（2）：134-140.

[12] Ge R，Sun H. Metallomics：An integrated biometal science. Sci China Chem，2009，52（12）：2055-2070.

[13] 李玉锋，高愈希，陈春英，等. 金属组学：高通量分析技术进展与展望. 中国科学：化学，2009，39（7）：580-589.

[14] Haraguchi H. Metallomics as integrated biometal science. J Anal Atom Spectrom，2004，19（1）：5-14.

[15] Sun H，Chai Z F. Metallomics：An integrated science for metals in biology and medicine. Annual Reports on the Progress of Chemistry Section A-Inorganic Chemistry，2010，106：20-38.

[16] Garcia-Sevillano M A，Garcia-Barrera T，Navarro F，et al. Use of metallomics and metabolomics to assess metal pollution in Donana National Park（SW Spain）. Environ Sci Technol，2014，48（14）：7747-7755.

[17] Gonzalez-Fernandez M，Garcia-Barrera T，Arias-Borrego A，et al. Metallomics integrated with proteomics in deciphering metal-related environmental issues. Biochimie，2009，91（10）：1311-1317.

[18] Gonzalez-Fernandez M，Garcia-Barrera T，Jurado J，et al. Integrated application of transcriptomics，proteomics，and metallomics in environmental studies. Pure Appl Chem，2008，80（12）：2609-2626.

[19] Hu L，He B，Wang Y，et al. Metallomics in environmental and health related research：Current status and perspectives. Chin Sci Bull，2013，58（2）：169-176.

[20] Lopez-Barea J，Gomez-Ariza J L. Environmental proteomics and metallomics. Proteomics，2006，6：S51-S62.

[21] Lobinski R，Moulin C，Ortega R. Imaging and speciation of trace elements in biological environment. Biochimie，2006，88（11）：1591-1604.

[22] Mounicou S，Szpunar J，Lobinski R. Metallomics：The concept and methodology. Chem Soc Rev，2009，38（4）：1119-1138.

[23] Szpunar J. Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis：Metallomics，metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. Analyst，2005，130（4）：442-465.

[24] Williams R J P. Chemical selection of elements by cells. Coord Chem Rev，2001，216：583-595.

[25] Maret W，Copsey M. Metallomics：Whence and whither. Metallomics，2012，4（10）：1017-1019.

[26] Dupont C L，Yang S，Palenik B，et al. Modern proteomes contain putative imprints of ancient shifts in trace metal geochemistry. Proc Natl Acad Sci USA，2006，103（47）：17822-17827.

[27] Anbar A D，Knoll A H. Proterozoic ocean chemistry and evolution：A bioinorganic bridge? Science，2002，297（5584）：1137-1142.

[28] Anbar A D. Elements and evolution. Science，2008，322（5907）：1481-1483.

[29] Dupont C L，Butcher A，Valas R E，et al. History of biological metal utilization inferred through phylogenomic

analysis of protein structures. Proc Nat Acad Sci USA，2010，107（23）：10567-10572.

[30] Oremland R S，Stolz J F. The ecology of arsenic. Science，2003，300（5621）：939-944.

[31] Stolz J F，Basu P，Oremland R S. Microbial transformation of elements：The case of arsenic and selenium. Intern Microbiol，2002，5（4）：201-207.

[32] Rhine E D，Garcia-Dominguez E，Phelps C D，et al. Environmental microbes can speciate and cycle arsenic. Environ Sci Technol，2005，39（24）：9569-9573.

[33] Lievremont D，Bertin P N，Lett M C. Arsenic in contaminated waters：Biogeochemical cycle，microbial metabolism and biotreatment processes. Biochimie，2009，91（10）：1229-1237.

[34] Hu H Y，Lin H，Zheng W，et al. Oxidation and methylation of dissolved elemental mercury by anaerobic bacteria. Nat Geosci，2013，6（9）：751-754.

[35] Mukhopadhyay R，Rosen B P，Pung L T，et al. Microbial arsenic：From geocycles to genes and enzymes. FEMS Microbiol Re v，2002，26（3）：311-325.

[36] Harvey C F，Swartz C H，Badruzzaman A B M. Arsenic mobility and groundwater extraction in Bangladesh. Science，2002，298（5598）：1602-1606.

[37] Chowdhury T R，Basu G K，Mandal B K，et al. Arsenic poisoning in the Ganges delta. Nature，1999，401（6753）：545-546.

[38] Polizzotto M L，Kocar B D，Benner S G，et al. Near-surface wetland sediments as a source of arsenic release to ground water in Asia. Nature，2008，454（7203）：505-508.

[39] Gu C，Xu H，Qiu G. The progress in research on mechanism of microbial mercury methylation and de-methylation. Environ Chem，2013，32（6）：926-936.

[40] Ekstrom E B，Morel F M M，Benoit J M. Mercury methylation independent of the acetyl-coenzyme a pathway in sulfate-reducing bacteria. Appl Environ Microbiol，2003，69（9）：5414-5422.

[41] Lin T Y，Kampalath R A，Lin C C，et al. Investigation of mercury methylation pathways in biofilm versus planktonic cultures of *Desulfovibrio desulfuricans*. Environ Sci Technol，2013，47（11）：5695-5702.

[42] Parks J M，Johs A，Podar M，et al. The genetic basis for bacterial mercury methylation. Science，2013，339（6125）：1332-1335.

[43] Wang W，Pan J. The transfer of methals in marine food chanis：A review. Acta Ecol Sin，2004，24（3）：599-604.

[44] Fu J J，Wang Y W，Zhou Q F，et al. Trophic transfer of mercury and methylmercury in an aquatic ecosystem impacted by municipal sewage effluents in Beijing，China. J Environ Sci-China，2010，22（8）：1189-1194.

[45] Cabana G，Rasmussen J B. Modeling food-chain structure and contaminant bioaccumulation using stable nitrogen isotopes. Nature，1994，372（6503）：255-257.

[46] Cristol D A，Brasso R L，Condon A M，et al. The movement of aquatic mercury through terrestrial food webs. Science，2008，320（5874）：335-335.

[47] http：//sofia.usgs.gov/sfrsf/（Sep 6，2015）.

[48] Zhuang P，Lu H，Li Z，et al. Multiple exposure and effects assessment of heavy metals in the population near mining area in South China. PloS one，2014，9（4）：e94484.

[49] Ronconi L，Sadler P J. Using coordination chemistry to design new medicines. Coord Chem Rev，2007，251（13-14）：1633-1648.

[50] Harada M. Minamata disease-methylmercury poisoning in japan caused by environmental-pollution. Crit Rev Toxicol，1995，25（1）：1-24.

[51] Fendorf S，Michael H A，van Geen A. Spatial and temporal variations of groundwater arsenic in South and Southeast Asia. Science，2010，328（5982）：1123-1127.

[52] Argos M，Kalra T，Rathouz P J，et al. Arsenic exposure from drinking water，and all-cause and chronic-disease mortalities in Bangladesh（HEALS）：A prospective cohort study. Lancet，2010，376（9737）：252-258.

[53] Karagas M R. Arsenic-related mortality in Bangladesh. Lancet，2010，376（9737）：213-214.

[54] Mutter J，Curth A，Naumann J，et al. Does inorganic mercury play a role in Alzheimer's disease? A systematic review and an integrated molecular mechanism. J Alzheimers Dis，2010，22（2）：357-374.

[55] Tsai A C，Pan S L，Liao C H，et al. Moscatilin，a bibenzyl derivative from the India orchid *Dendrobrium loddigesii*，suppresses tumor angiogenesis and growth *in vitro* and *in vivo*. Cancer Lett，2010，292：163-170.

[56] Ou L，Chen C，Chen L，et al. Low-level prenatal mercury exposure in North China：An exploratory study of anthropometric effects. Environ Sci Technol，2015，49（11）：6899-6908.

[57] Kim B M，Lee B E，Hong Y C，et al. Mercury levels in maternal and cord blood and attained weight through the 24 months of life. Sci Total Environ，2011，410-411：26-33.

[58] McRae R，Bagchi P，Sumalekshmy S，et al. *In situ* imaging of metals in cells and tissues. Chem Rev，2009，109（10）：4780-4827.

[59] Korbas M，Blechinger S R，Krone P H，et al. Localizing organomercury uptake and accumulation in zebrafish larvae at the tissue and cellular level. Proc Natl Acad Sci USA，2008，105（34）：12108-12112.

[60] de Jonge M D，Holzner C，Baines S B，et al. Quantitative 3D elemental microtomography of *Cyclotella meneghiniana* at 400-nm resolution. Proc Natl Acad Sci USA，2010，107（36）：15676-15680.

[61] Lombi E，de Jonge M D，Donner E，et al. Trends in hard X-ray fluorescence mapping：Environmental applications in the age of fast detectors. Anal Bioanal Chem，2011，400（6）：1637-1644.

[62] Ko S K，Yang Y K，Tae J，et al. *In vivo* monitoring of mercury ions using a rhodamine-based molecular probe. J Am Chem Soc，2006，128（43）：14150-14155.

[63] Yang Y K，Ko S K，Shin I，et al. Synthesis of a highly metal-selective rhodamine-based probe and its use for the *in vivo* monitoring of mercury. Nat Protoc，2007，2（7）：1740-1745.

[64] Carter K P，Young A M，Palmer A E. Fluorescent sensors for measuring metal ions in living systems. Chem Rev，2014，114（8）：4564-4601.

[65] Sabine Becker J. Imaging of metals in biological tissue by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry（LA-ICP-MS）：State of the art and future developments. J Mass Spectrom，2013，48（2）：255-268.

[66] Becker J S，Zoriy M，Matusch A，et al. Bioimaging of metals by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry（LA-ICP-MS）. Mass Spectrom Rev，2010，29（1）：156-175.

[67] Becker J S，Jakubowski N. The synergy of elemental and biomolecular mass spectrometry：New analytical strategies in life sciences. Chem Soc Rev，2009，38（7）：1969-1983.

[68] Qin Z Y，Caruso J A，Lai B，et al. Trace metal imaging with high spatial resolution：Applications in biomedicine. Metallomics，2011，3（1）：28-37.

[69] Fletcher J S，Lockyer N P，Vickerman J C. Developments in molecular sims depth profiling and 3d imaging of biological systems using polyatomic primary ions. Mass Spectrom Rev，2011，30（1）：142-174.

[70] Seyfferth A L，Webb S M，Andrews J C，et al. Arsenic localization，speciation，and co-occurrence with iron on rice（*Oryza sativa* L.）roots having variable Fe coatings. Environ Sci Technol，2010，44（21）：8108-8113.

[71]　Hu L G，Cheng T F，He B，et al. Identification of metal-associated proteins in cells by using continuous-flow gel electrophoresis and inductively coupled plasma mass spectrometry. Angew Chem Int Ed，2013，52（18）：4916-4920.

[72]　Hagege A，Huynh T N S，Hebrant M. Separative techniques for metalloproteomics require balance between separation and perturbation. TrAC-Trend Anal Chem，2015，64：64-74.

[73]　Yun Z J，Li L，Liu L H，et al. Characterization of mercury-containing protein in human plasma. Metallomics，2013，5（7）：821-827.

[74]　Cvetkovic A，Menon A L，Thorgersen M P，et al. Microbial metalloproteomes are largely uncharacterized. Nature，2010，466（7307）：779-782.

[75]　Haraguchi H，Ishii A，Hasegawa T，et al. Metallomics study on all-elements analysis of salmon egg cells and fractionation analysis of metals in cell cytoplasm. Pure Appl Chem，2008，80（12）：2595-2608.

[76]　Feng W Y，Meng W，Ming G A，et al. Mercury speciation and mercury-binding protein study by HPLC-ICP-MS on the estimation of mercury toxicity between maternal and infant rats. J Anal At Spectrom，2011，26（1）：156-164.

[77]　Maltez H F，Villanueva Tagle M，Fernandez de la Campa Mdel R，et al. Metal-metallothioneins like proteins investigation by heteroatom-tagged proteomics in two different snails as possible sentinel organisms of metal contamination in freshwater ecosystems. Anal Chim Acta，2009，650（2）：234-240.

[78]　Gonzalez-Fernandez M，Garcia-Barrera T，Arias-Borrego A，et al. Metal-binding molecules in the organs of Mus musculus by size-exclusion chromatography coupled with UV spectroscopy and ICP-MS. Anal Bioanal Chem，2008，390（1）：17-28.

[79]　Wang M，Feng W Y，Wang H J，et al. Analysis of mercury-containing protein fractions in brain cytosol of the maternal and infant rats after exposure to a low-dose of methylmercury by SEC coupled to isotope dilution ICP-MS. J Anal At Spectrom，2008，23（8）：1112-1116.

[80]　Hasegawa T，Asano M，Takatani K，et al. Speciation of mercury in salmon egg cell cytoplasm in relation with metallomics research. Talanta，2005，68（2）：465-469.

[81]　Liu Y，Li W，Lao F，et al. Intracellular dynamics of cationic and anionic polystyrene nanoparticles without direct interaction with mitotic spindle and chromosomes. Biomaterials，2011，32（32）：8291-8303.

[82]　Shi J W，Feng W Y，Wang M，et al. Investigation of mercury-containing proteins by enriched stable isotopic tracer and size-exclusion chromatography hyphenated to inductively coupled plasma-isotope dilution mass spectrometry. Anal Chim Acta，2007，583（1）：84-91.

第 5 章　纳米金属组学

纳米材料由于其独特的性能被广泛应用于许多领域。然而，由于纳米材料可直接作用于生物体并且通过环境和食物链进入生物系统，其潜在的安全性受到越来越多的关注[1-5]。例如，一些研究表明，纳米颗粒进入生物体后沉积在肺部，不被肺泡巨噬细胞吞噬，还可进入肺间质引起炎症反应[6，7]。动物实验已经观察到纳米颗粒可以迅速地从肺和胃肠上皮组织进入生物体的循环系统[8]。因此，研究纳米材料的毒理学效应是必要的，近年来一个新的研究领域——纳米毒理学已经兴起[9-11]。除了对纳米材料毒理学效应进行研究外，阐明纳米材料生物学效应（包括毒理学和有益效应）也是非常重要的，因为它不仅可以保护人类健康和环境的完整性，而且有助于纳米材料的充分利用。

在近几十年中，组学研究已经获得了极大的关注，尤其是基因组学、蛋白质组学和代谢组学，它们主要研究和量化生物分子的特性及功能，及其在生物体的结构、功能和动力学特性[12-14]。同样，金属组学主要系统地研究生命体内金属原子的吸收、运输、代谢及其功能，并且联合生物信息学推测其潜在的性能，因此，受到了越来越多的关注[15，16]。它还包括系统地研究金属组与基因、蛋白质、代谢物和其他生物分子的相互作用和功能[17]。自 2007 年以来，国际上已经成功地举行了五届金属组学会议。2009，英国皇家化学开始出版权威期刊 *Metallomics*[18，19]。

然而，据我们所知，金属组学研究中的金属通常是指天然存在的微尺度材料，并没有考虑纳米级金属相关的人造材料。如上所述，与微尺度材料相比，纳米尺寸材料可展现出完全不同的性质。因此，“纳米金属组学”是金属组学的一个分支，我们已对利用先进的核分析技术开展纳米金属组学研究进行过综述[20]。此外，2013 年 7 月，在西班牙举办的第四届金属组学会议上，纳米金属组学已成为一个独立的专题[21]。

在本章中，我们将系统地综述纳米材料在生物体的吸收、分布、代谢和排泄（ADME）行为，以及它们与基因、蛋白质等的相互作用。虽然很多相关的研究近期已发表，本章只能有选择性和有代表性地引用。

5.1　金属相关纳米材料

金属相关纳米材料（metal-related nanomaterials），包括金属本身的和含有金属的纳米材料，由于其独特的晶体形式力学、电学、磁学、光学及催化特性，

通常用作催化剂、传感器或探测器等[22]。金属、金属晶体、金属纳米簇、金属氧化物，与其他金属的多组分核壳纳米材料，金属间或合金化的纳米材料，金属荧光纳米簇和金属纳米粒子为基础的混合纳米材料均可归类为金属相关纳米材料。

贵金属纳米材料有机结合了贵金属独特的物理化学性质与纳米材料的特殊性能，如铂、钯、银和金纳米材料等。量子点（QDs）是半导体纳米材料（2～100nm），以它们为核心组成各种金属化合物，如半导体、贵金属和磁性过渡金属，它也可以被看作金属纳米材料。作为典型的金属氧化物，氧化铁纳米颗粒广泛应用于不同的医疗领域。金属富勒烯（富勒烯被金属原子包围）是一种新型富勒烯材料，在生物医药领域有极广泛的应用，这种材料也可被看作含金属的纳米材料[23]。内嵌富勒烯是将一些原子嵌入富勒烯碳笼而形成的一类新型内嵌富勒烯，如钪、钇、镧、钙、锶和钡以及镧系金属富勒烯（Ce～Lu）。这些金属原子被包在富勒烯内，尤其是在 C_{82} 内。除了金属富勒烯外，金属包围的多壁碳纳米管（MWCNTs）[24]和金属填充的单壁碳纳米管（SWCNTs）[25]，也可视为含金属纳米材料。在本节中，所有这些金属或含金属的纳米材料都被归类为金属相关纳米材料（图 5-1）。

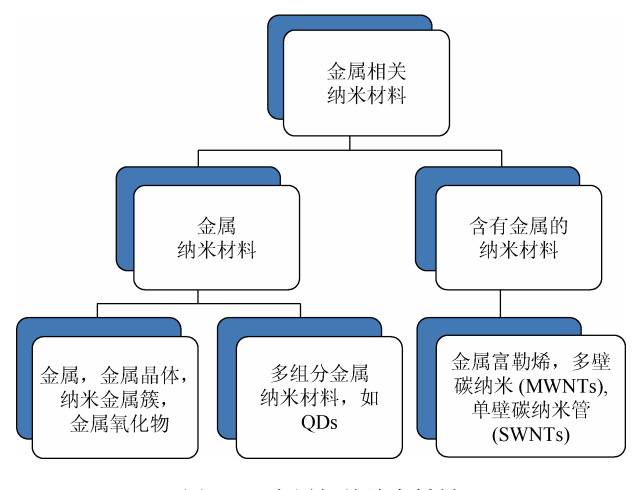


图 5-1　金属相关纳米材料

5.2　金属相关纳米材料在生物体内吸收、分布、代谢及排泄

动物可通过不同的途径暴露金属相关纳米材料，如摄入、吸入和皮肤吸收等。这些金属相关纳米材料在生物体的吸收、分布、代谢和排泄受到它们的物理化学性质、暴露途径和沉积部位的影响。综合的分析方法可以应用于金属相关纳米材料的表征及研究其在生物体的吸收、分布、代谢和排泄［图 5-2（a）］[26]。

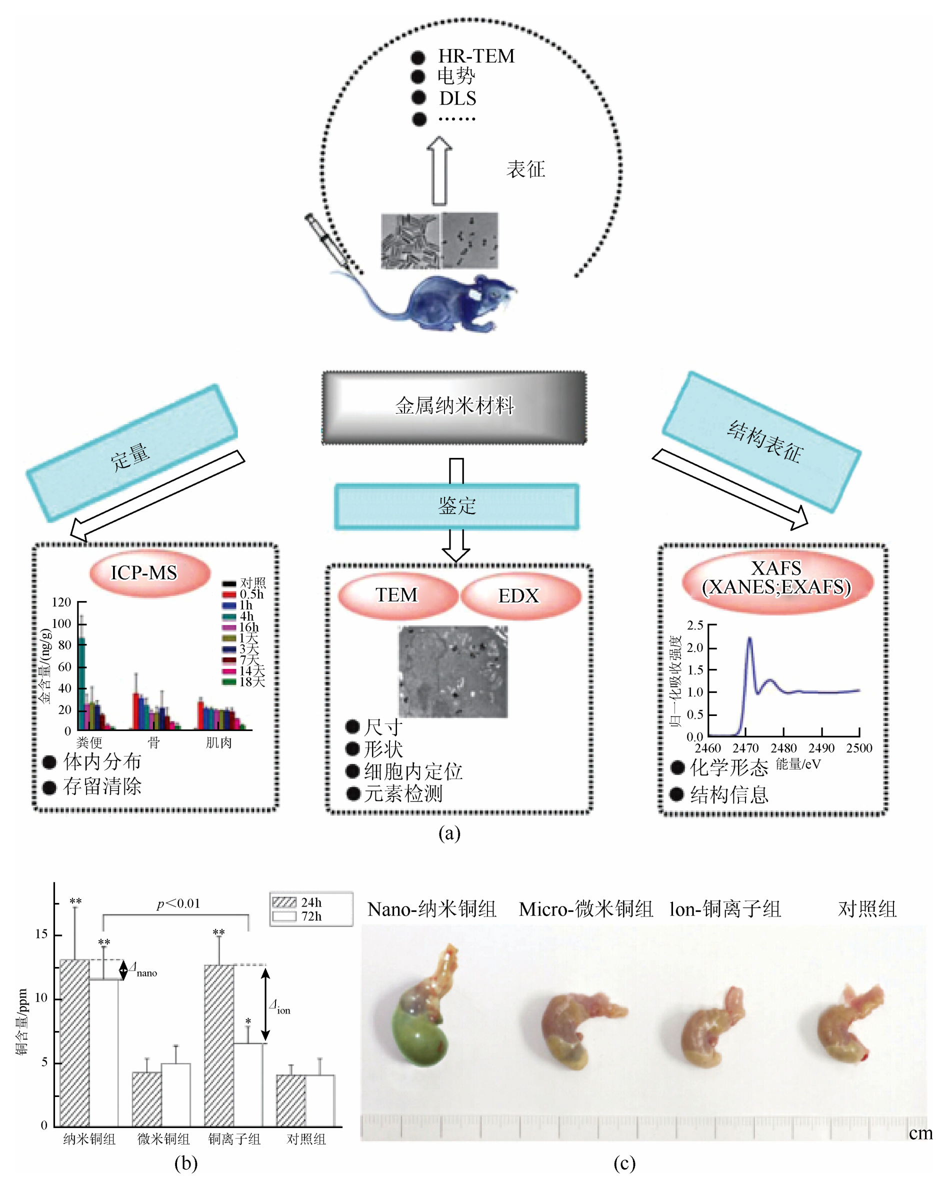


图 5-2 （a）系统分析纳米材料在体内的分布及表征。高分辨透射电镜、动态光散射（DLS）可以观察纳米材料的表征。纳米材料的定量、识别和结构表征可以通过 ICP-MS、EDX-TEM 和 XAFS 来实现。（b）铜在小鼠肾组织中的水平，其中使用的是纳米铜、微米铜和铜离子，浓度为 70mg/kg。星号表示的铜含量显著高于对照组（$*p<0.05$；$**p<0.01$）。在纳米铜和铜离子组，小鼠肾脏铜含量较高，相比之下，微米铜组及对照组之间没有差别。在铜离子组，喂食小鼠 72h 后，Cu 在肾脏含量急剧下降（Δ_{ion}），然而，纳米铜暴露 72h 后，小鼠体内 Cu 含量保持稳定（Δ_{nano}）。（c）单一口服喂食小鼠 24h 后胃部变化，纳米铜处理后，小鼠出现胃部膨胀及明显的颜色变化（图片引用得到 Elsevier 许可[26, 27]）

5.2.1　金属相关纳米材料的吸收和排泄

通过口服摄入途径可以延长纳米材料在体内的存留时间。Meng 等[27]每天给小鼠喂食纳米铜粒子（浓度为 70mg/kg）观察小鼠体内铜含量。他们发现富集 24h 后小鼠肾组织富集大量的纳米铜和铜离子［图 5-2（b）和（c）］。72h 后，肾组织中的铜离子含量从（12.6±2.2）μg/g 下降到（6.5±1.3）μg/g，然而纳米铜组肾脏含铜量仍然保持在较高含量的水平［（11.5±2.5）μg/g]。这意味着在肾脏清除纳米铜的速率非常低，48h 内仅有 1.5μg/g 被还原。Oughton 等[28]通过饮食给蚯蚓摄入钴纳米粉末研究其在体内的吸收和排泄（平均粒径 4nm，表面积 $59m^2/g$）。结果发现，暴露 7 天后蚯蚓对钴纳米粒子的吸收达到峰值（纳米颗粒与马粪肥的浓度比为 0.16～0.20），且在蚯蚓体内可保留 8 周，只有低于 20%纳米颗粒被排出体外。

经呼吸暴露的纳米材料表现出不同的吸收和排泄行为。Kreyling 等[29]利用 ^{192}Ir 纳米颗粒对大鼠进行吸入暴露以研究其吸收和排泄行为。他们发现，1 周后大鼠体内纳米颗粒主要通过气道进入胃肠道，并在吸入后 1 周后通过粪便排出体外。此外，体内所沉积的微粒通过肺部进入次级器官如肝、脾、心脏和大脑的转移率低于 1%。80nm 粒子的转移率比 15nm 粒子的小一个数量级。

在大鼠体内通过静脉注射纳米材料，也会影响其在体内的吸收和排泄行为。Fischer 等[30]发现包覆有巯基十一酸和交联赖氨酸（表示为 QD-LM）量子点（QDs）在血浆中清除率为（0.59±0.16）mL/(min·kg)。较高的清除率［（1.23±0.22）mL/(min·kg)］出现在偶联牛血清白蛋白的量子点（表示为 QD-BSA，$p<0.05$）。静脉注射 10 天后，在粪便或尿液仍检测不到该量子点。与此相反，Chen 等发现在小鼠体内注射二氧化硅包覆的 CdSe 量子点通过粪便和尿液排出体外，其清除率分别为 33.3%和 23.8%[31]。这是由于这些 CdSe 量子点纳米材料的包覆材料不同。

在一般情况下，脊椎动物生物体将纳米粒子作为异物，并倾向于通过主排泄器官/系统识别并将其清除。研究发现，尺寸超过 100nm 的纳米粒子将被网状内皮系统（RES）捕获，低于 5nm 尺寸的颗粒可以由肾脏除去[32]。

5.2.2　金属相关纳米材料在生物体内的分布

研究纳米粒子在生物体的分布，可以更好地了解金属相关纳米材料在细胞、组织、动物及生态系统的生物效应。

研究纳米粒子在动物体内的分布通常需要处死动物。Liu 等[33]对小鼠鼻腔滴入铜纳米颗粒（23.5nm）后，对其分布进行研究［图 5-3（a）］。滴入一周后，铜纳米粒子在肝脏、肾脏、嗅球和血液中含量比对照组显著升高（40mg/kg，每周

三次），通过病理学检查可以清楚地看到肝、肾和嗅球受损。因此，鼻吸入高浓度的铜颗粒，能够转移到其他器官和组织，最终诱导某些病变。

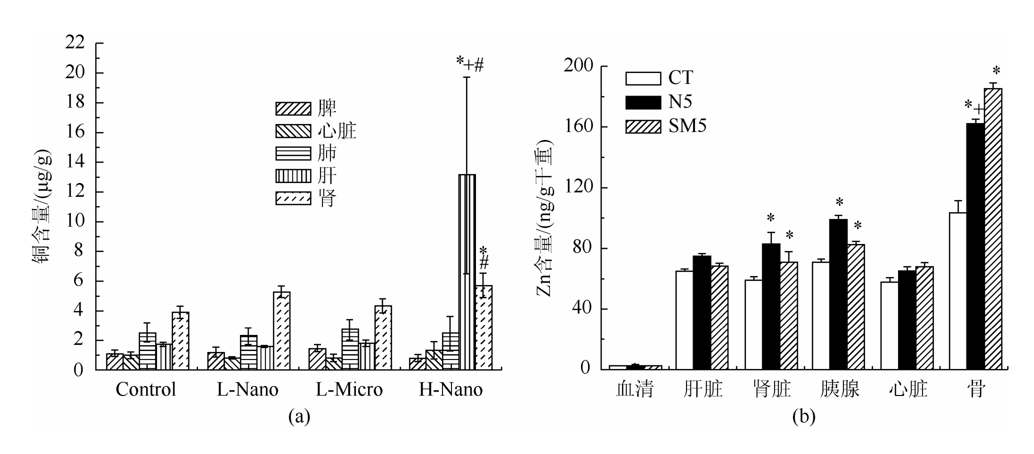


图 5-3　（a）小鼠鼻腔滴注 1（低剂量）或 40mg/kg（体重）（高剂量）不同尺寸铜颗粒一周后体内不同器官中铜的含量情况。*代表与对照组相比具有显著差异（Dunnett 检验，$p<0.05$），#代表与 1mg/kg 体重微米铜组相比具有显著差异（t 检验，$p<0.05$），+代表与 1mg/kg 体重纳米铜组相比具有显著差异（t 检验，$p<0.05$）；（b）小鼠连续灌胃剂量为 5g/kg 体重氧化锌粉末 14 天后血液及脏器中锌的含量变化。图中 CT 代表对照组；N5 代表剂量为 5g/kg（体重）20nm 氧化锌组；SM5 代表剂量为 5g/kg（体重）120nm 氧化锌组（图片引用得到 America Scientific Publisher 和 Springer 许可[33, 34]）

Wang 等[34]研究了 20nm 和 120nm 的 ZnO 以 1g/kg（体重）、2g/kg（体重）、3g/kg（体重）、4g/kg（体重）、5g/kg（体重）的剂量经口摄入给健康成年小鼠后，Zn 在小鼠体内的分布。小鼠暴露在 5g/kg 的纳米 ZnO 后，Zn 在组织血清的积累见图 5-3（b）。小鼠暴露 5g/kg 20nm ZnO 后，与对照组比，锌的含量在肾脏、胰脏和骨中显著增加（$p<0.05$），ZnO 在小鼠的肝脏和心脏略有增加。与此相反，120nm 的 ZnO 处理的小鼠，在肝脏、肾脏和胰腺 Zn 含量比 20nm ZnO 处理组的高些，这表明更多的 Zn 可以从 20nm 的 ZnO 处理的给药小鼠排泄要相对多些。在所观察的器官中，骨中 Zn 含量最高。在 120nm ZnO 处理的小鼠骨中 Zn 含量显著高于 20nm ZnO 处理的小鼠。作者推测肝、脾、心脏、胰脏和骨是 20nm 和 120nm ZnO 口服暴露的靶器官。在许多其他金属相关纳米材料如金、银纳米粒子的分布研究发现，肝脏和脾脏也是靶器官[35, 36]。

利用同位素标记的方法可以非侵入性研究纳米材料在生物体的分布。例如，人们使用计算机断层扫描与单光子发射计算机断层扫描仪（CT-SPECT）研究了

静脉注射 ^{125}I 标记的银纳米颗粒在 Balb/c 小鼠体内的分布。24h 后，银纳米颗粒主要在脾（41.5%ID/g）和肝（24.5%ID/g）积累[37]。正电子发射断层扫描（PET）成像显示，小鼠体内 $^{64}Cu^{2+}$标记的量子点（15.1±7.6nm）经由肾小球过滤排出并最终在肝脏积累[38]。

Zhu 等[39]通过气管内滴注 nano-$^{59}Fe_2O_3$ 发现，纳米颗粒可以通过肺泡毛细血管屏障进入全身循环，并在 10min 内进入雄性 SD 大鼠体内。Nano-$^{59}Fe_2O_3$ 在肺部被分配到富含单核吞噬细胞的肝、脾、肾和睾丸等器官。血浆 nano-$^{59}Fe_2O_3$ 清除的半衰期为 22.8 天，肺清除率为每天 3.06μg。$^{59}Fe_2O_3$ 在肺外部被重新分配并输送到许多器官，表明 $^{59}Fe_2O_3$ 可以很容易穿过许多组织隔室并积聚在肺外器官内。^{59}Fe 在肝脏中积累最多，在脾、心脏、肾脏、胰腺、睾丸和脑中依次减少。^{59}Fe 在肝脏和心脏中积累从灌注第 1 天到 21 天持续增加，而在第 50 天降低。灌注后，^{59}Fe 在脾脏中一直呈持续性较高水平，直到第 50 天。

所有这些研究表明金属相关纳米材料主要分布在网状内皮系统，这就需要在细胞水平进一步研究纳米粒子材料与肝脏和脾组织的相互作用。这为评价金属相关纳米材料在体内的影响和潜在毒性提供有价值的依据。

研究金属相关纳米材料在特定动物器官和组织，或者小尺寸动物模型，甚至在细胞中的分布需要特定的研究工具。Wang 等[40]研究了两种不同晶形的 TiO_2 纳米颗粒（80nm 金红石和 155nm 锐钛矿；纯度＞99%）在小鼠脑中的分布，每隔一天在小鼠鼻内滴注 500μg TiO_2 粒子悬浮液，并持续 30 天，利用同步辐射 X 射线荧光法（XRF）观察 TiO_2 在脑中的分布。他们发现 30 天试验后，钛主要积累在大脑皮质、丘脑和海马体，尤其是在海马体中的 CA1 和 CA3 区（图 5-4）。钛

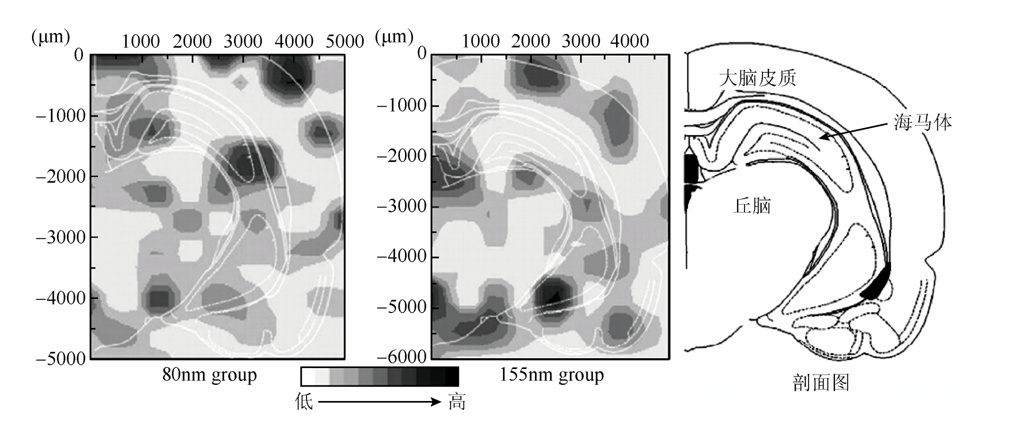
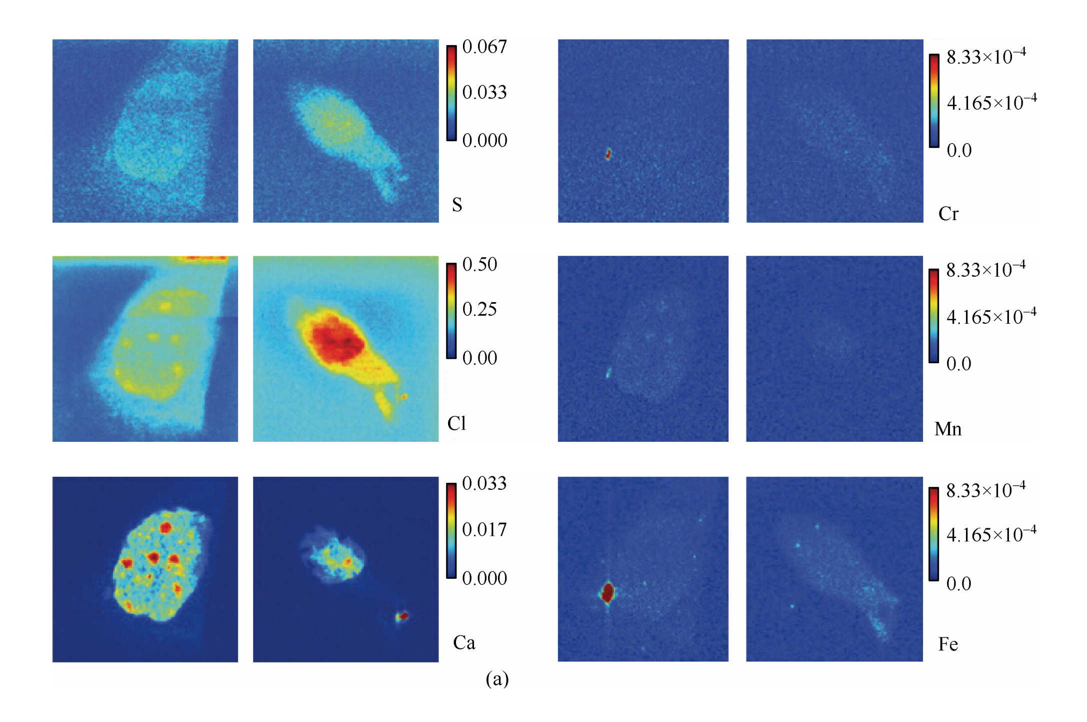


图 5-4　小鼠鼻内注入 80nm 和 150nm 纳米颗粒 30 天后，SRXRF 成像分析 Ti 在小鼠脑部的分布（图片引用得到 Elsevier 许可[40]）

在海马体中显著的增加导致明显的不规则排列和海马体神经元的损失。金红石和锐钛矿型 TiO_2 纳米颗粒主要在小鼠脑中积累尤其是在海马体内积累，这表明 TiO_2 纳米颗粒可以经由嗅球进入大脑[40，41]。

Gao 等[42]利用 SRXRF 成像研究 Cu 纳米颗粒在线虫全身的分布时发现，线虫暴露于铜纳米粒子后，导致体内铜和钾水平明显升高，并且线虫体内 Cu 的生物分布发生了变化。铜的积累主要发生在头部和身体前 1/3 处。相反，铜离子暴露后，在线虫身体其他部位发现有较高含量的 Cu，尤其是在其排泄细胞和肠部。无损和多元素同步辐射 X 射线荧光分析（SRXRF）为研究低等生物线虫体内元素分布提供了重要的方法。

具有纳米尺寸的空间分辨率的 SRXRF 方法（nanoXRF）可用于研究金属相关纳米材料在细胞中的分布。例如，Corezzi 等[43]研究了量子点在 SKOV3 癌细胞中的分布。他们对存在于该核-壳量子点的元素（如 S、Zn、Cd 和 Se）在细胞内的分布进行了分析（图 5-5）。结果发现，构成量子点的壳的 Zn 和 S 虽然可在细胞质中被检测到，但其信号主要位于细胞核区。另外，Cd 信号几乎检测不到，而 Se 信号在标记的样品的细胞质中检测到，但在对照样品细胞质和细胞核中均没有发现。



(a)

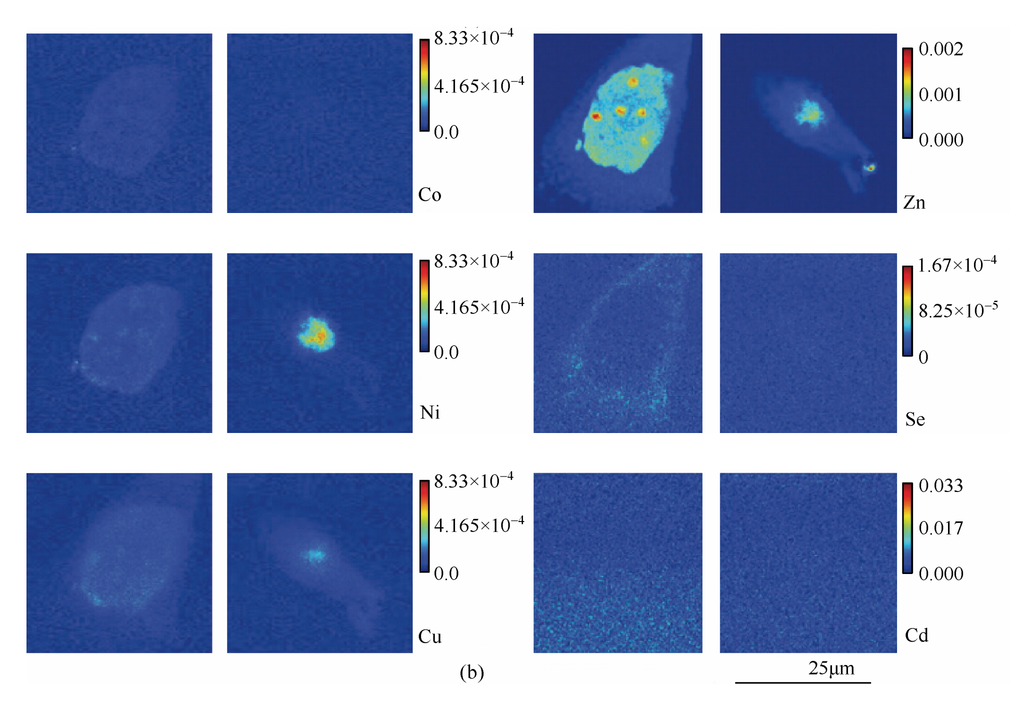


图 5-5　纳米 X 射线荧光（60nm）图，包括环氧树脂和固定在氮化硅上的人类卵巢癌细胞的部分。（a）b-微管蛋白标记的硒化镉量子点；（b）对照样品。元素浓度为 g/cm^3。（图片引用得到 Elsevier 许可[43]）

SRXRF 技术也被用于研究细胞与碳纳米管的相互作用。Bussy 等[44]通过监测在大多数合成技术所用的催化剂金属粒子，研究了未纯化的和纯化的单壁和多壁碳纳米管（CNT）在巨噬细胞中的分布。SRXRF 技术既可以观察到单细胞水平 CNT 的定位，也可同时分析细胞元素的组成的变化。

同步辐射 X 射线荧光（SRXRF）的机时有限，激光烧蚀-电感耦合等离子体质谱（LA-ICP-MS）是一个方便可替代的实验技术。LA-ICP-MS 具有样品制备简单、灵敏度高、多元素检测和高空间分辨率等特点。应用 LA-ICP-MS 研究了金和银纳米颗粒在单个成纤维细胞的分布，发现它们积聚在核周区域且随孵育时间而增加[45]。

5.2.3　金属相关纳米材料在生物体内的代谢

金属相关纳米材料进入体内后，可能会被溶解、分解、氧化或还原，这可能会导致电子和/或离子在其晶格中的转移或释放到周围环境中。金属相关纳米材料溶解、分解、氧化或还原后形成的金属离子即“传统的金属组学”研究的金属离子；然而，未发生代谢的纳米颗粒仍显示其独特的纳米特性。

纳米材料可溶于类似生理环境的介质中，并形成部分可溶性金属离子或金属配体复合物。Franklin 等[46]比较了纳米和普通 ZnO 粉末在淡水中的溶解情况，结果发现纳米 ZnO 颗粒可快速溶解并会像普通 ZnO 粉末那样形成 mg/L 浓度范围的饱和溶液。随后，他们发现纳米 ZnO、普通 ZnO 粉末和 $ZnCl_2$ 对 *P. subcapitata* 的毒性接近，表明毒性是由溶解态的锌引起的。另外，研究人员也观察到氧化铁纳米颗粒在溶酶体的酸性条件或在含配位体具有较强亲和性的微环境下出现溶解度升高的现象[47，48]。

纳米材料的毒性也可能是由它们分解所致。Derfus 等[49]发现 Cd^{2+}可从 CdSe 量子点中释放出来，还发现在氧化的空气中和紫外线曝光的样品中，CdSe 量子点的细胞毒性与自由 Cd^{2+}的浓度相关。另外，Qu 等[50]也发现 CdSe@ZnS 量子点可在线虫体内被降解，且 Se^{2+}可被氧化为 Se^{4+}。上述两个研究表明，量子点可以在体内被分解，导致了量子点的纳米毒性。

X 射线吸收光谱（XAS）是研究金属相关纳米材料在生物系统中的电子和/或离子传输及代谢产物结构信息的一个强有力的工具。Wang 等利用 XAS 对金纳米棒在 SD 大鼠体内代谢情况进行了研究，发现金纳米棒可长期滞留在肝脏和脾脏中，并没有被氧化，这表明金纳米棒在体内呈惰性状态[26]。然而，对于其他元素，在体内发现了其氧化态。例如，Auffan 等[51]研究了三种铁纳米粒子在大肠杆菌中的代谢。他们研究三种化合物，包括 γ-Fe_2O_3、Fe_3O_4 和 γ-FeOOH 的铁的 K 边 XAS 光谱，发现三种化合物有不同的边前吸收峰强度，边前吸收峰与主峰位置及收位峰位置。边前吸收峰信息表明，与水中大肠杆菌接触后，磁铁矿中 Fe^{II}可被氧化成 Fe^{III}。通过 X 射线衍射（XRD）和 XAS 图谱显示，在相同的条件下，零价纳米铁（nZVI）中所有的 Fe^0 是高度氧化活性，并转化为 γ-FeOOH 和 Fe_3O_4。Fe^0 和 Fe^{II}的氧化导致离子或电子在纳米颗粒表面转移，由于它们在细胞膜表面并与细菌接触，这有可能干预细菌代谢。因此，作者得出结论，含亚铁和零价铁的 Fe 纳米颗粒的毒性是由于活性氧或在电子/离子传输过程中产生的。此项研究表明，金属纳米材料的表面性能可能会受到活性氧（ROS）的影响而产生毒性，而适当的表面修饰可以生产生物相容性更好、更安全的金属纳米材料。

即使惰性纳米材料也可以诱导细胞代谢变化。利用 ^1H 核磁共振谱（NMR）研究了 AuNRs 所致的 A549 和 16HBE 细胞内与时间相关的代谢变化情况，如图 5-6 所示[52]。存在于细胞提取物中主要的代谢物包括氨基酸、有机酸（如乳酸、肌酸和柠檬酸）、膜的代谢物（如胆碱、磷酸胆碱、甘油磷酸胆碱）和许多核苷和核苷酸（如肌苷、腺苷、尿嘧啶、肌苷-5′-单磷酸和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸）。乳酸含量在 16HBE 和 A549 细胞中明显降低，表明蛋白质包裹的 Au 纳米颗粒抑制了细胞内糖酵解过程。

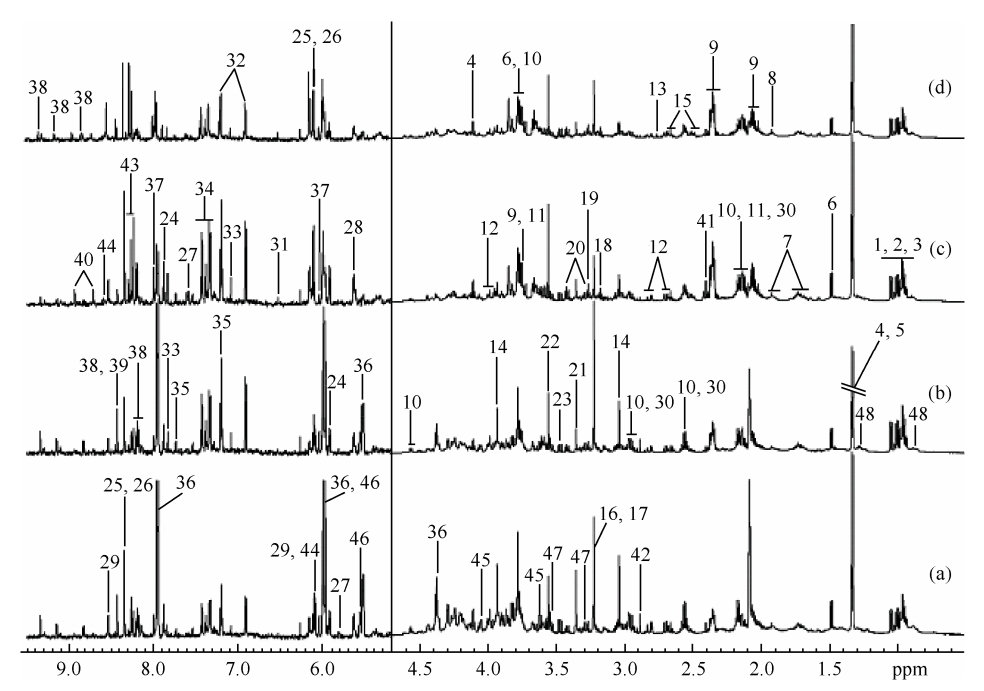


图 5-6　蛋白包裹的 Au 纳米颗粒处理（b，d）和未处理（a，c）的 16HBE 和 A549 细胞的提取液 600MHz ^{1}H 的核磁共振谱。δ 5.2～9.5 在光谱的该区域垂直扩展 8 倍与 δ 0.5～4.7 区域进行比较。主要物质：1. 异亮氨酸；2. 亮氨酸；3. 缬氨酸；4. 乳酸；5. 苏氨酸；6. 丙氨酸；7. 赖氨酸；8. 乙酸；9. 谷氨酸；10. 谷胱甘肽（还原态）；11. 谷氨酰胺；12. 天门冬氨酸；13. 二甲胺；14. 肌酸；15. 柠檬酸盐；16. 磷酸胆碱；17. 甘油磷酸胆碱；18. 胆碱；19. 氧化三甲胺（TMAO）；20. 牛磺酸；21. 甲醇；22. 甘氨酸；23. 亚磷酸二甲酯；24. 尿苷；25. 肌苷；26. 腺苷；27. 尿嘧啶；28. 尿苷二磷酸葡萄糖；29. 肌苷-5′-单磷酸（5′-IMP）；30. 谷胱甘肽（氧化态）；31. 富马酸；32. 酪氨酸；33. 组氨酸；34. 苯丙氨酸；35. 色氨酸；36. 尿苷二磷酸尿苷（UDP）-*N*-乙酰基葡糖胺；37. 鸟苷；38. 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD）；39. 甲酸；40. 烟酰胺；41. 琥珀酸；42. 三甲胺；43. 次黄嘌呤；44. 单磷酸腺苷（AMP）；45. 肌醇；46. UDP-*N*-乙酰半乳糖胺；47. 半胱氨酸；48. 脂质（图片引用得到 Elsevier 许可[52]）

5.3　生物系统中金属相关纳米材料与基因、蛋白质和其他生物分子的相互作用

金属相关纳米材料及其代谢物可以与基因、蛋白质和生物系统中的其他生物分子发生相互作用，这可能会导致不同的生物响应。

纳米材料被设计赋予了各种独特的性能，这将影响其与 DNA 可能的直接或间接的相互作用。Landsiedel 等[53]没有观察到二氧化钛和氧化锌纳米材料在体外（艾姆斯沙门氏菌基因突变试验和 V79 微核染色体突变试验）或在体内（小鼠骨髓微核试验

和吸入纳米材料的大鼠肺部细胞彗星 DNA 损伤试验）的基因毒性。然而，对洋葱中银纳米粒子的研究发现它们可以进入植物系统，并可能损害细胞分裂的各个时期，造成染色质桥，黏滞，分裂中期紊乱，多个染色体断裂和细胞解体[54]。对于大多数纳米材料来说，这仍是一个未知数：它们是否能直接与 DNA 发生相互作用，或是通过间接影响，如炎症介导的氧化应激可能预示着一些纳米材料遗传毒性的阈值[55]。

如上所述，量子点已被用作在生物应用荧光标记物。然而，有必要确定量子点本身是否会引起不利影响，方能将其应用于体内研究或在基于 DNA 的测定法中使用。Green 等[56]通过质粒切口试验观察到水溶性的 CdSe 量子点对 DNA 的损伤（图 5-7）。在避光环境中量子点孵育过的 DNA 样品也显示出损伤的条带，这种条带在 DNA 单独储存于暗处的试验中没有被观察到。值得注意的是，DNA 与量子点孵育的试验中条带强度远远低于没有量子点的试验中的条带强度。这可归因于 DNA 在孵育过程中与量子点的结合，导致了可分离的 DNA 的减少。高达 70%的 DNA 与量子点非特异性结合造成该实验无法进行。因此，利用纳米材料开展 DNA 相关试验及体内应用时应当慎重。

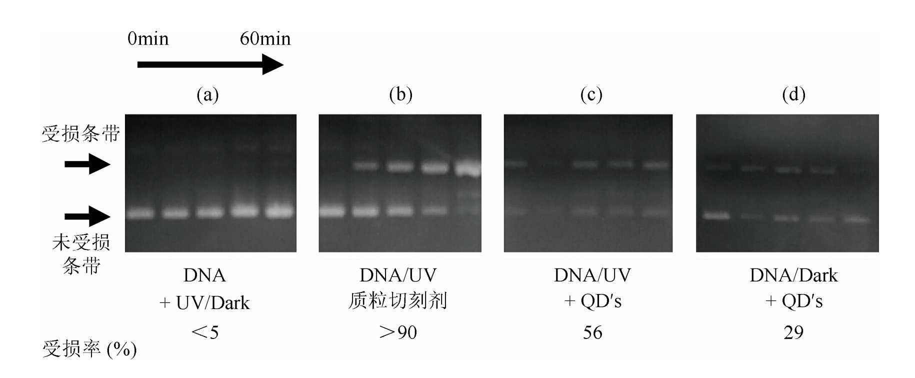


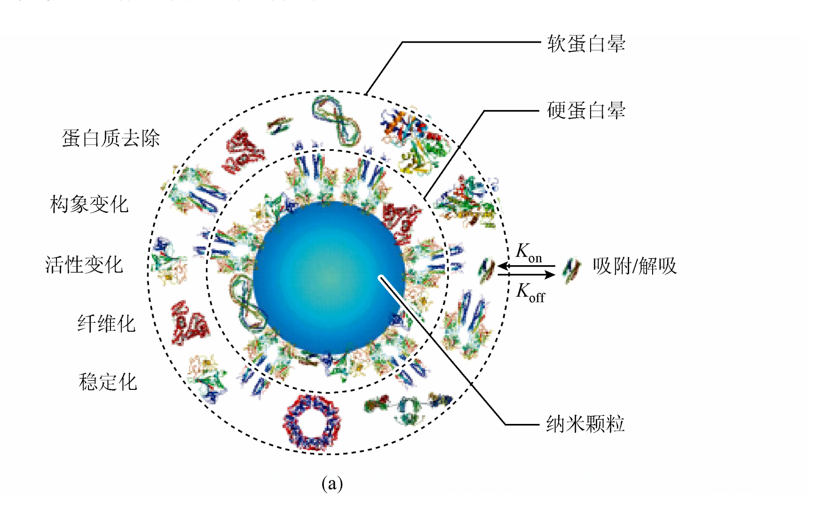
图 5-7　超螺旋 DNA 的质粒切口试验。从左至右表示每 15min（0～60min）采取一次的片段。（a）紫外线激发/黑暗后的 DNA，所有的 DNA 超螺旋完好无损；（b）DNA 与已知质粒切刻剂孵育，显示出 DNA 超螺旋从完好（0min）到几乎完全破坏（60min）；（c）与量子点孵育并受到紫外线激发后的 DNA，显示出几乎恒定水平的损伤；（d）DNA 在黑暗中与量子点孵育，显示出一个较弱的损伤带（图片引用得到 RSC 许可 [56]）

研究表明，纳米颗粒能刺激或抑制免疫反应。Liu 等[57]研究了 Gd@$C_{82}(OH)_{22}$ 纳米颗粒对 Th1/Th2 细胞因子释放的影响，发现了显著增强的免疫反应以刺激免疫细胞释放更多的细胞因子，从而帮助消除异常细胞。胞外体是细胞外分泌的膜性囊泡，可以充当天然纳米级粒子（如病毒）的分散和细胞间输送的工具。暴露于磁性氧化铁纳米颗粒下，树突细胞的成熟和脾 T 细胞的活化过程被这些胞外体显著诱导。此外，胞外体诱导的 T 细胞活化在敏化的 T 细胞和卵白蛋白（OVA）

致敏的小鼠中比在未敏化的相应物质中更有效。研究表明，胞外体可以作为纳米颗粒诱导的免疫系统响应中肺外信号转导的传送工具[47]。

作为异物，纳米材料进入机体内需通过皮肤、肺、胃肠道等途径，而这些过程受免疫系统保护和控制，这将引发一系列蛋白水解酶的形成，并可能导致免疫毒性[58]。例如，树突状细胞与金纳米粒子孵育的细胞毒性研究表明，这些纳米粒子即使在高浓度也没有细胞毒性，但可以观察到大量金纳米粒子在细胞内吞物中显著聚集。此外，细胞因子的分泌在发生内化作用后得到显著缓和，这表明可能发生了对免疫响应的潜在扰动[59]。

当纳米粒子进入机体生理环境，它们能迅速吸附一层蛋白质，形成蛋白晕[60-62]［图 5-8（a）］。研究人员发现，纳米粒子的特性，如尺寸、形状和表面电荷可能影响其对蛋白质的吸附以及被吸附的蛋白质的结构。这将进一步影响纳米颗粒与细胞的反应性及纳米粒子的吸收途径和效率。例如，纳米粒子可加速蛋白质和多肽的纤维化，这一过程与多种疾病如阿尔茨海默病有关[63]。吸附的蛋白质还可以促进纳米粒子跨细胞屏障的迁移，在重要器官中被清除或积累。了解这种复杂的相互作用的动力学可以为理解细胞毒性、潜在炎症以及这些新兴材料的其他重要特性提供有力的依据，这些重要特性可以被开发用于发展更安全、更有价值的纳米材料。另外，蛋白晕中的蛋白性质十分保守，与纳米粒子的类型无关。纳米材料的尺寸和表面效应在决定由相同材料组成的不同纳米粒子的蛋白晕方面发挥着重要的作用[64]。蛋白晕具有改变纳米材料尺寸和界面组成的潜能，使得它们的生物特性较合成特性有所变化。例如，吸附到纳米粒子上的蛋白质的熔点会随着组成和尺寸发生变化[65]。通过对纳米粒子和蛋白质相互作用的透彻了解有助于人们针对性地调控纳米粒子表面性质以使它们吸附具有特定功能的蛋白质分子或药物小分子。此外，这种知识在预测纳米毒性相关安全问题方面也是有用的。



(a)

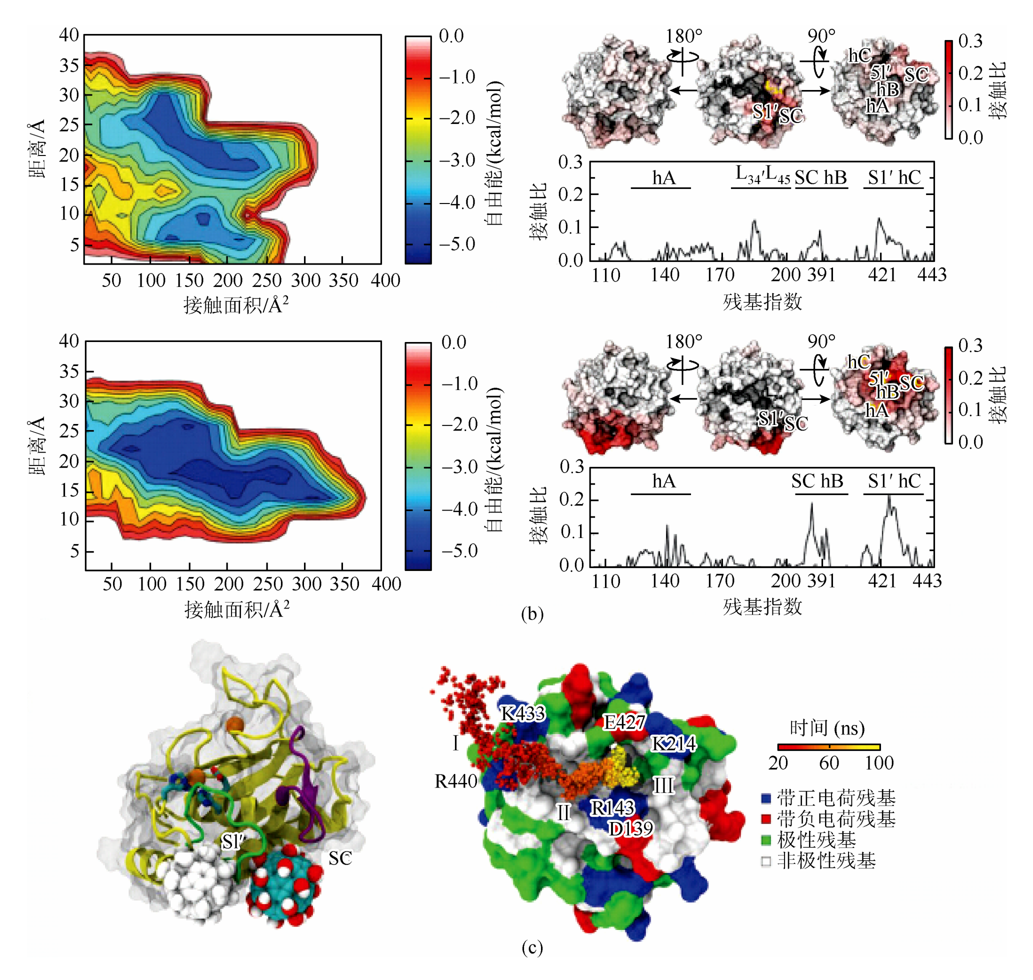


图 5-8　纳米颗粒中的蛋白晕。（a）纳米颗粒表面上结合的蛋白质会引起一系列的后果，如蛋白质和多肽的纤维化，分散度与表面电荷变化以及纳米材料的溶解；（b）有代表性的结合模式（一个实心球），这表明 Gd@$C_{82}(OH)_{22}$ 的结合位于 S1′配体的特异性环（浅色带）和 SC 环（深色带）之间，从而导致配体结合在基质金属蛋白酶-9 的凹槽中（图片引用得到 Wiley 和 NAS 许可[62, 66]）

纳米粒子还可以干扰癌细胞的生物学过程，这有助于设计药物用于癌症治疗。例如，人们发现，金属富勒烯纳米颗粒制成的 Gd@$C_{82}(OH)_{22}$ 能渗透肿瘤细胞的质膜，导致实体瘤的收缩，并降低负责催化体内活性氧生成的酶的活性[67-69]。此外，抗顺铂的人类前列腺癌细胞与 Gd@$C_{82}(OH)_{22}$ 预处理后增强了顺铂在细胞间的积累并通过恢复人类前列腺癌细胞有缺陷的细胞内吞作用从而使顺铂-DNA 复合物形成。结果表明，Gd@$C_{82}(OH)_{22}$ 的纳米粒子可以通过恢复有缺陷的内吞作用的机理增加顺铂在细胞内的积累[70]。更重要的是，最近的一项研究发现，Gd@$C_{82}(OH)_{22}$ 可以通过降低基

质金属蛋白酶（MMP-9）活性抑制胰腺癌转移的发生。这种对 MMP-9 活性的抑制可以通过修饰 S1′环与进入配体的结合相互干扰来实现［图 5-8（b）］[66]。分子动力学模拟，揭示了 $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ 与 MMP-9 相互作用的分子机理，这为从头设计纳米药物用于致命疾病如胰腺癌的治疗提供了新的思路。在 pH 7.4 条件下孵育时带负电荷的牛血清蛋白很容易吸附在金纳米棒的表面，可以在透射电镜图像中看到 6nm 厚的灰色壳环绕在金纳米棒的表面。血清蛋白包裹的金纳米棒保持着它们的稳定性，这在调控细胞摄取、细胞内运输以及导致金保纳米棒在癌细胞的线粒体中选择性积累的溶酶体易感性方面发挥了重要的作用[69]。

DNA 与纳米材料的相互作用有望应用于医学中。羟基化的 C_{60} 实际上是一个类似于多元酸的分子，羟基（C—OH）的每个质子都可以在水溶液中解离，从而生成共轭碱 C—O—。富勒烯可以通过自组装封装一些质粒 DNA，通过这种自组装纳米辅药可以实现作为质粒 DNA 载体和宿主免疫活化剂的双重功能[71]。聚（二烯丙基二甲基氯化铵）（PDDAC）和聚乙烯亚胺（PEI）可被吸附在纳米棒的表面上。这些 PDDAC 或 PEI 修饰的金纳米棒可以显著促进细胞免疫和体液免疫以及通过活化抗原呈现细胞来实现 T 细胞增殖[72]。人工合成的 CpG 寡脱氧核苷酸可以模拟细菌 DNA 并有效刺激哺乳动物的免疫系统[73, 74]。自组装的多价 CpG-金纳米粒子复合物能增强细胞摄取的效率并刺激细胞因子的分泌[75]。以上这些发现揭示了这样一个事实，那就是针对性设计低毒性纳米材料与生物分子之间相互作用有助于药物和基因输送以及生物医学应用。

5.4　结论与展望

作为金属组学的分支，纳米金属组学研究金属相关纳米材料生物效应（图 5-9）。这包括系统研究金属相关材料在生物系统中的吸收、分布、代谢和排泄。此外，它

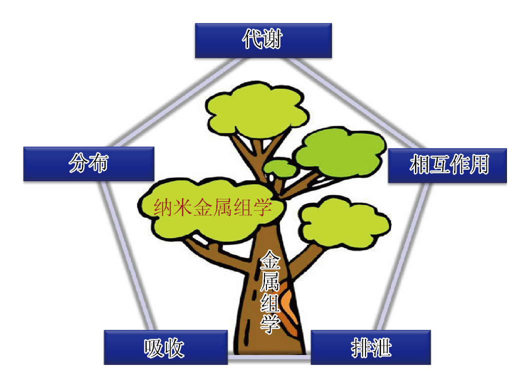


图 5-9　纳米金属组学

也涉及系统研究金属相关纳米材料与生物体内的基因、蛋白质、代谢物和其他生物分子的相互作用和功能。

金属相关纳米材料在生物系统中的吸收、分布、代谢和排泄受它们的物理化学性质、暴露途径和沉积部位的微环境所影响。纳米材料不仅可以直接或间接与基因、蛋白质和其他分子相互作用引起 DNA 损伤、遗传毒性、免疫毒性和/或细胞毒性，也可能刺激免疫反应、规避肿瘤抗药性、抑制肿瘤转移。

由于纳米金属组学是一个新兴的研究领域，有关风险评估和金属相关纳米材料的生物学行为的研究结果有时相互矛盾。因此，纳米金属组学的研究需要建立一个规范的研究程序。此外，专用的分析工具，包括之前文章中提到的核分析技术在这个领域中也是必要的[20，73]。金属组学中的分析手段也适用于纳米金属组学[15，16，74，75]，但再次强调应注意考虑纳米材料的独特性能。此外，纳米金属组学连同金属组学需要与其他组学如基因组学、蛋白质组学和代谢组学一同发展来提高金属相关纳米材料性能，降低其潜在危害。

（李玉锋　王黎明　陈春英　柴之芳）

参 考 文 献

[1] Brumfiel G. Nanotechnology：A little knowledge. Nature，2003，424（6946）：246-248.

[2] Colvin V L. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. Nat Biotechnol，2003，21（10）：1166-1170.

[3] Service R F. Nanomaterials show signs of toxicity. Science，2003，300（5617）：243.

[4] Hoet P H M，Nemmar A，Nemery B. Health impact of nanomaterials？Nat Biotechnol，2004，22（1）：19.

[5] Zhao Y，Xing G，Chai Z. Nanotoxicology：Are carbon nanotubes safe？Nat Nanotechnol，2008，3（4）：191-192.

[6] Oberdörster G. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. Int Arch Occup Environ Health，2000，74（1）：1-8.

[7] Oberdörster G，Sharp Z，Atudorei V，et al. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. Inhal Toxicol，2004，16（6-7）：437-445.

[8] Nemmar A，Hoylaerts M F，Hoet P H M，et al. Ultrafine particles affect experimental thrombosis in an *in vivo* hamster model. Am J Respir Crit Care Med，2002，166（7）：998-1004.

[9] Zhao Y，Nalwa H S. Nanotoxicology-Interactions of Nanomaterials with Biological Systems. California：American Scientific Publishers，2006.

[10] Oberdörster G，Oberdörster E，Oberdörster J. Nanotoxicology：An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. Environ Health Perspect，2005，113（7）：823-839.

[11] Chen C，Li Y F，Qu Y，et al. Advanced nuclear analytical and related techniques for the growing challenges in nanotoxicology. Chem Soc Rev，2013，42（21）：8266-8303.

[12] Seemungal D，Newton G. Human Genome Project. In Sydney B，Jeffrey H M. Encycl Gen，Editors-in-Chief. New York：Academic Press，2001：980-981.

[13] James P. Protein identification in The post-genome era：The rapid rise of proteomics. Quart Rev Biophy，1997，

30（4）：279-331.

[14] Nicholson J K，Lindon J C. Systems biology：Metabonomics. Nature，2008，455（7216）：1054-1056.

[15] Haraguchi H. Metallomics as integrated biometal science. J Anal At Spectrom，2004，19（1）：5-14.

[16] Mounicou S，Szpunar J，Lobinski R. Metallomics：The concept and methodology. Chem Soc Rev，2009，38（4）：1119-1138.

[17] Geys J，Nemmar A，Verbeken E，et al. Acute toxicity and prothrombotic effects of quantum dots：Impact of surface charge. Environ. Health Perspect，2008，116（12）：1607-1613.

[18] http://blogs. rsc. org/mt/2012/11/14/metallomics-2013-8-11-july-oviedo-spain/

[19] http://pubs.rsc.org/en/journals/journalissues/mt#!recentarticles&all.

[20] Li Y F，Wang L，Zhang L，et al. Nuclear-based metallomics in metallic nanomaterials：Nanometallomics. In Chen C，Chai Z，Gao. Nuclear Analytical Techniques for Metallomics and Metalloproteomics. Cambridge：RSC publishing，2010.

[21] http://blogs. Rsc. org/mt/2013/01/08/metallomics-2013-themed-issue/

[22] Buzea C，Pacheco I I，Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles：Sources and toxicity. Biointerphases，2007，2（4）：MR17-MR71.

[23] Wilson L J，Cagle D W，Thrash T P，et al. Metallofullerene drug design. Coord Chem Rev，1999，190-192：199-207.

[24] Espinosa E H，Ionescu R，Bittencourt C，et al. Metal-decorated multi-wall carbon nanotubes for low temperature gas sensing. Thin Solid Films，2007，515（23）：8322-8327.

[25] Bendall J S，Ilie A，Welland M E，et al. Thermal stability and reactivity of metal halide filled single-walled carbon nanotubes. J Phys Chem B，2006，110（13）：6569-6573.

[26] Wang L，Li Y F，Zhou L，et al. Characterization of gold nanorods *in vivo* by integrated analytical techniques：Their uptake，retention，and chemical forms. Anal Bioanal Chem，2010，396（3）：1105-1114.

[27] Meng H，Chen Z，Xing G，et al. Ultrahigh reactivity provokes nanotoxicity：Explanation of oral toxicity of nano-copper particles. Toxicol Lett，2007，175（1-3）：102-110.

[28] Oughton D H，Hertel-Aas T，Pellicer E，et al. Neutron activation of engineered nanoparticles as a tool for tracing their environmental fate and uptake in organisms. Environ Toxicol Chem，2008，27（9）：1883-1887.

[29] Kreyling W G，Semmler M，Erbe F，et al. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. J Toxicol Environ Health A，2002，65（20）：1513-1530.

[30] Fischer H C，Liu L，Pang K S，et al. Pharmacokinetics of nanoscale quantum dots：*In vivo* distribution，sequestration，and clearance in the rat. Adv Funct Mater，2006，16（10）：1299-1305.

[31] Chen Z，Chen H，Meng H，et al. Bio-distribution and metabolic paths of silica coated CdSeS quantum dots. Toxicol Appl Pharmacol，2008，230（3）：364-371.

[32] Li Y F，Chen C. Fate and toxicity of metallic and metal-containing nanoparticles for biomedical applications. Small，2011，7（21）：2965-2980.

[33] Liu Y，Gao Y，Zhang L，et al. Potential health impact on mice after nasal instillation of nano-sized copper particles and their translocation in mice. J Nanosci Nanotechnol，2009，9：1-9.

[34] Wang B，Feng W，Wang M，et al. Acute toxicological impact of nano- and submicro-scaled zinc oxide powder on healthy adult mice. J Nanopart Res，2008，10（2）：263-276.

[35] Lankveld D P K，Oomen A G，Krystek P，et al. The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes. Biomaterials，2010，31（32）：8350-8361.

[36] de Jong W H，Hagens W I，Krystek P，et al. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. Biomaterials，2008，29（12）：1912-1919.

[37] Chrastina A，Schnitzer J E. Iodine-125 radiolabeling of silver nanoparticles for *in vivo* SPECT imaging. Int J Nanomed，2010，5：653-659.

[38] Tu C，Ma X，House A，et al. PET imaging and biodistribution of silicon quantum dots in mice. ACS Med Chem Lett，2011，2（4）：285-288.

[39] Zhu M T，Feng W Y，Wang Y，et al. Particokinetics and extrapulmonary translocation of intratracheally instilled ferric oxide nanoparticles in rats and the potential health risk assessment. Toxicol Sci，2009，107（2）：342-351.

[40] Wang J，Chen C，Liu Y，et al. Potential neurological lesion after nasal instillation of TiO_2 nanoparticles in the anatase and rutile crystal phases. Toxicol Lett，2008，183（1-3）：72-80.

[41] Wang J，Liu Y，Jiao F，et al. Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO_2 nanoparticles. Toxicology，2008，254（1-2）：82-90.

[42] Gao Y，Liu N，Chen C，et al. Mapping technique for biodistribution of elements in a model organism，*Caenorhabditis elegans*，after exposure to copper nanoparticles with microbeam synchrotron radiation X-ray fluorescence. J Anal At Spectrom，2008，23：1121-1124.

[43] Corezzi S，Urbanelli L，Cloetens P，et al. Synchrotron-based X-ray fluorescence imaging of human cells labeled with CdSe quantum dots. Anal Biochem，2009，388（1）：33-39.

[44] Bussy C，Cambedouzou J，Lanone S，et al. Carbon nanotubes in macrophages：Imaging and chemical analysis by X-ray fluorescence microscopy. Nano Lett，2008，8（9）：2659-2663.

[45] Drescher D，Giesen C，Traub H，et al. Quantitative imaging of gold and silver nanoparticles in single eukaryotic cells by laser ablation ICP-MS. Anal Chem，2012，84（22）：9684-9688.

[46] Franklin N M，Rogers N J，Apte S C，et al. Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO，bulk ZnO，and $ZnCl_2$ to a freshwater microalga（*Pseudokirchneriella subcapitata*）：The importance of particle solubility. Environ Sci Technol，2007，41（24）：8484-8490.

[47] Zhu M，Li Y，Shi J，et al. Exosomes as extrapulmonary signaling conveyors for nanoparticle-induced systemic immune activation. Small，2012，8（3）：404-412.

[48] Wang B，Yin J J，Zhou X，et al. Physicochemical origin for free radical generation of iron oxide nanoparticles in biomicroenvironment：Catalytic activities mediated by surface chemical states. J Phys Chem C，2013，117（1）：383-392.

[49] Derfus A M，Chan W C W，Bhatia S N. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. Nano Lett，2003，4（1）：11-18.

[50] Qu Y，Li W，Zhou Y，et al. Full assessment of fate and physiological behavior of quantum dots utilizing *Caenorhabditis* elegans as a model organism. Nano Lett，2011，11（8）：3174-3183.

[51] Auffan M，Achouak W，Rose J，et al. Relation between the redox state of iron-based nanoparticles and their cytotoxicity toward *Escherichia coli*. Environ Sci Technol，2008，42（17）：6730-6735.

[52] Zhang L，Wang L，Hu Y，et al. Selective metabolic effects of gold nanorods on normal and cancer cells and their application in anticancer drug screening. Biomaterials，2013，34（29）：7117-7126.

[53] Landsiedel R，Kapp M D，Schulz M，et al. Genotoxicity investigations on nanomaterials：Methods，preparation

and characterization of test material，potential artifacts and limitations-many questions，some answers. Mut Res，2009，681（2-3）：241-258.

[54] Kumari M，Mukherjee A，Chandrasekaran N. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. Sci Total Environ，2009，407（19）：5243-5246.

[55] Ng C T，Li J J，Bay B H，et al. Current studies into the genotoxic effects of nanomaterials. J Nucl Acids，2010，2010：1-12.

[56] Green M，Howman E. Semiconductor quantum dots and free radical induced DNA nicking. Chem Comm，2005，122（1）：121-123.

[57] Liu Y，Jiao F，Qiu Y，et al. The effect of Gd@$C_{82}(OH)_{22}$ nanoparticles on the release of Th1/Th2 cytokines and induction of TNF-α mediated cellular immunity. Biomaterials，2009，30：3934-3945.

[58] Dobrovolskaia M A，McNeil S E. Immunological properties of engineered nanomaterials. Nat Nanotechnol，2007，2（8）：469-478.

[59] Villiers C，Freitas H，Couderc R，et al. Analysis of the toxicity of gold nano particles on the immune system：Effect on dendritic cell functions. J Nanopart Res，2010，12（1）：55-60.

[60] Walkey C D，Chan W C W. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. Chem Soc Rev，2012，41（7）：2780-2799.

[61] Ge C，Du J，Zhao L，et al. Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity. Proc Natl Acad Sci USA，2011，108（41）：16968-16973.

[62] Yang S T，Liu Y，Wang Y W，et al. Biosafety and bioapplication of nanomaterials by designing protein-nanoparticle interactions. Small，2013，9（9-10）：1635-1653.

[63] Linse S，Cabaleiro-Lago C，Xue W F，et al. Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles. Proc Natl Acad Sci USA，2007，104（21）：8691-8696.

[64] Lundqvist M，Stigler J，Elia G，et al. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. Proc Natl Acad Sci USA，2008，105（38）：14265-14270.

[65] Laera S，Ceccone G，Rossi F，et al. Measuring protein structure and stability of protein-nanoparticle systems with synchrotron radiation circular dichroism. Nano Lett，2011，11（10）：4480-4484.

[66] Kang S G，Zhou G，Yang P，et al. Molecular mechanism of pancreatic tumor metastasis inhibition by Gd@$C_{82}(OH)_{22}$ and its implication for de novo design of nanomedicine. Proc Natl Acad Sci USA，2012，109（38）：15431-15436.

[67] Yin J J，Lao F，Fu P P，et al. The scavenging of reactive oxygen species and the potential for cell protection by functionalized fullerene materials. Biomaterials，2009，30（4）：611-621.

[68] Chen C，Xing G，Wang J，et al. Multihydroxylated [Gd@ $C_{82}(OH)_{22}]_n$ nanoparticles：Antineoplastic activity of high efficiency and low toxicity. Nano Lett，2005，5（10）：2050-2057.

[69] Wang J，Chen C，Li B，et al. Antioxidative function and biodistribution of [Gd@$C_{82}(OH)_{22}]_n$ nanoparticles in tumor-bearing mice. Biochem Pharmacol，2006，71（6）：872-881.

[70] Liang X J，Huang B，Meng H，et al. Metallofullerene nanoparticles overcome tumor resistance to cisplatin by reactivating endocytosis Proc Natl Acad Sci USA，2010，107（16）：7449-7454.

[71] Xu L，Liu Y，Chen Z，et al. Morphologically virus-like fullerenol nanoparticles act as the dual-functional nanoadjuvant for HIV-1 vaccine. Adv Mater，2013，25（41）：5928-5936.

[72] Xu L，Liu Y，Chen Z，et al. Surface-engineered gold nanorods：Promising DNA vaccine adjuvant for HIV-1

treatment. Nano Lett，2012，12（4）：2003-2012.

[73] Gao Y，Chen C Y，Chai Z F. Advanced nuclear analytical techniques for metalloproteomics. J Anal At Spectrom，2007，22：856-866.

[74] Hu L，He B，Wang Y，et al. Metallomics in environmental and health related research：Current status and perspectives. Chin Sci Bull，2013，58（2）：169-176.

[75] Tenzer S，Docter D，Kuharev J，et al. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. Nat Nanotechnol，2013，8（10）：772-781.

第 6 章　我国金属组学研究进展

我国金属组学研究紧跟国际金属组学研究步伐。2005 年，我国学者江桂斌、金钦汉等及时将金属组学概念引入了国内[1, 2]。2008 年，首届国际金属组学会议召开后不久，中国科学院高能物理研究所柴之芳团队就组织召开了我国首届金属组学研讨会[3]。2009 年，中国科学院高能物理研究所柴之芳团队[4]、香港大学孙红哲团队[5]和复旦大学谭相石团队[6]在《中国科学 B 辑：化学》发表专辑，系统介绍了金属组学的概念、方法学及相关研究实例。2010 年，中国科学院高能物理研究所柴之芳团队受英国皇家化学会（RSC）邀请，组织国内外专家编写出版了 *Nuclear Analytical Techniques for Metallomics and Metalloproteomics* 一书[7]，该书是国际上第一本系统介绍金属组学研究方法，特别是核技术方法的英文专著。该书还首次提出了纳米金属组学（nanometallomics）概念，并在 RSC 出版的 *Metallomics* 杂志中做了进一步阐述[8]，本书第 5 章对纳米金属组学及其研究内容进行了系统阐述。

2015 年，我国成功主办了第五届国际金属组学会议[9]，来自美国、加拿大、法国、日本、韩国、德国、英国、西班牙、俄罗斯、中国香港及中国等 18 个国家和地区近 200 名代表参加了本次会议，标志着我国金属组学研究获得了国际同行的认可。会议主席为中国科学院高能物理研究所柴之芳院士和清华大学张新荣教授。“金属组学”概念提出者、国际金属组学会议发起人、日本名古屋大学荣誉退休教授 Haraguchi，中国科学院生态环境研究中心江桂斌院士，法国国家科学研究院 Lobinski 教授，美国印第安纳大学 Hieftje 教授，加拿大阿尔伯特大学 Le 教授，香港大学孙红哲教授及国家纳米科学中心赵宇亮研究员等受邀做了大会报告。江桂斌院士在本次会议上首次提出了“环境金属组学”概念，本书第 4 章也对环境金属组学进行了阐述。国家纳米科学中心陈春英研究员、德国明斯特大学 Sperling 教授、伦敦国王学院 Maret 教授、中国科学院高能物理研究所张智勇研究员等 42 位金属组学领域科学家受邀做了会议重点报告。大会还评选出 6 名优秀青年科技工作者，授予他们优秀墙报奖，其中三位来自中国，分别为中国科学院高能物理研究所李云云、厦门大学刘创基和武汉大学陈贝贝。

6.1　我国学者在 *Metallomics* 等杂志任职与发表文章情况

Metallomics 杂志创刊于 2009 年，是迄今金属组学领域唯一一本专业杂志，也是发布金属组学研究最新成果的旗舰杂志，2014 年该杂志的影响因子为

3.585[10]。该杂志涵盖所有与金属相关生物体系的研究，报道包括分析方法学、生物无机化学、环境科学及药物化学等多个领域的相关研究进展，读者群涵盖分析化学、生物地球化学、生物信息学、生物催化、生物环境科学、细胞生物学、临床化学、环境健康、药物学、金属生物化学、微生物学、营养化学、药理学、植物生物化学、生理学及毒理学等多个领域。

Metallomics 杂志编辑委员会由来自英国、美国、西班牙、中国、日本和加拿大等国的 9 位科学家组成，我国国家纳米科学中心陈春英研究员为该委员会成员。该杂志顾问委员会由 27 位科学家组成，分别来自美国、巴西、西班牙、中国、日本、德国、奥地利、印度、波兰、法国、英国、加拿大及中国香港，我国中国科学院高能物理研究所柴之芳院士、香港大学孙红哲教授为该委员会成员。由此可见，该刊无论是编辑委员会还是顾问委员会都有我国学者参与。

除 *Metallomics* 杂志，同样由 RSC 出版发行的 *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 杂志最早刊载了 Haraguchi 教授系统阐述“金属组学”概念的文章[11]，并先后两次组织“金属组学”专辑[12, 13]，对金属组学的发展起了重要的推动作用。*Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 杂志编辑委员会由来自比利时、加拿大、德国、英国、巴西、中国、美国及日本等国 13 位科学家组成，我国厦门大学杭纬教授为该编辑委员会成员之一。该杂志顾问委员会由 36 位科学家组成，我国科学家高山（中国地质大学）、侯贤灯（四川大学）、胡斌（武汉大学）、胡兆初（中国地质大学）、Kelvin Leung（香港浸会大学）及吕弋（四川大学）等为该顾问委员会成员。

为展示我国学者在金属组学领域的活跃程度，我们对发表在 *Metallomics* 杂志的论文数目进行了统计。截至 2015 年第 7 卷第 12 期，该杂志共刊载学术论文 908 篇，其中我国学者发表的论文数为 102 篇，占总刊文数的 11.2%。图 6-1 显示了

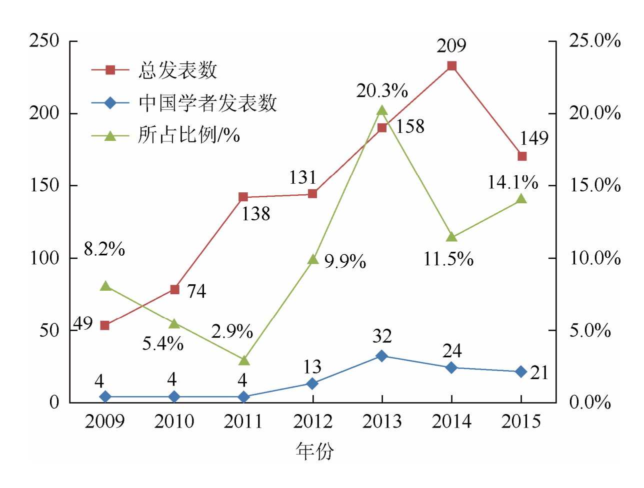


图 6-1　中国学者在 *Metallomics* 杂志发表文章数目及所占比例

我国学者按年度在 *Metallomics* 杂志上发表文章的情况。从图中可以看出，*Metallomics* 杂志的刊文数目逐年上升，而我国学者在该刊发表文章的数目也呈逐年上升趋势，特别是 2013 年，我国学者在该刊发表论文 32 篇，占总发文数的 20.3%，这应该与当年该刊组织出版了中国金属组学研究专辑（Metallomics in China）有关[14]，但整体而言，我国学者近年在该刊发表论文数目的比例达到了 10%以上。

我们也对国内科研机构在 *Metallomics* 杂志上发表论文的情况进行了统计。截至 2015 年第 7 卷第 12 期，我国共有 29 家科研机构在该杂志上发表过论文，其中发表过两篇及以上论文的科研机构共 15 家，见图 6-2。由图 6-2 可看出，中国科学院、香港大学、暨南大学、北京大学、中山大学、中国科学技术大学等 6 家科研机构共发表论文 58 篇，占我国学者所发文章总数的 56.8%，而浙江大学、复旦大学、中国人民大学、香港中文大学、厦门大学、四川大学、深圳大学、首都医科大学及广东药学院等 9 家科研机构共发表论文 33 篇，占文章总数的 32.3%。另有南方医科大学、山西大学、安徽师范大学、香港城市大学、浙江中医药大学、南京农业大学、中国农业大学、天津医科大学、广西师范大学、吉林大学、上海交通大学、大连理工大学及湘潭大学等 14 家科研机构共发表论文 14 篇，占文章总数的 10.9%。

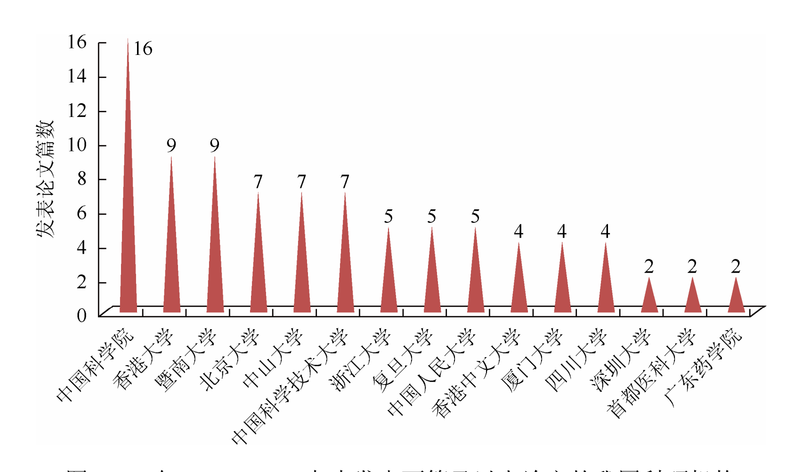


图 6-2　在 *Metallomics* 杂志发表两篇及以上论文的我国科研机构

从论文的研究内容看，我国学者所发表的文章集中在生物无机化学、环境科学及药物化学等领域。清华大学张新荣教授认为，中国在原子光谱分析方面有非常强的队伍，有很好的国际地位。但是，近年来传统的原子光谱分析方法相对成熟了，从科研角度看似乎具有原创性的研究成果少了，高影响因子的论文也发表得少了。金属组学研究的兴起给从事原子光谱研究的学者带来了新机遇。如果做原子光谱的学者中有一部分能转到金属组学研究，用原子光谱解决生命科学中的

相关科学问题，这很可能会是原子光谱的第二个春天[15]。

6.2　我国学者利用金属组学技术研究金属蛋白的进展

我国金属组学在金属蛋白领域的研究进展包括对细菌和哺乳动物细胞内各类金属蛋白如金属转运蛋白、金属伴侣蛋白、金属酶等的功能研究；在蛋白质组层面利用生物信息学方法对金属蛋白的搜索以及利用分析化学方法对生物样品中的金属蛋白进行分离鉴定。

Wood-Ljungdahl 通路广泛存在于厌氧细菌和古细菌中，用于合成代谢和分解代谢。该通路中主要涉及四种金属蛋白/金属酶：甲酸脱氢酶、钴铁硫蛋白、乙酰辅酶 A 合成酶和 CO 脱氢酶。2009 年，复旦大学谭相石课题组对该四种金属蛋白/金属酶的结构、性质、功能及催化机理的研究进展进行了较完整的综述[16]。此前，谭相石与 Lindahl 等通过一系列晶体结构以及蛋白定点突变等试验研究了双功能复合酶乙酰辅酶 A 合成酶/CO 脱氢酶（ACS/CODH）的分子通道网络及其作用机理，结合实验证据与理论计算，推断出其催化动力学模型，用来描述该反应的催化机理，并且，谭相石等使用快速反应动力学手段首次测定了该催化反应机理中的各分步反应动力学常数（平衡常数和速率常数），包括甲基转移、CO 插入、乙酰基向 CoA 的转移以及乙酰辅酶 A 的合成四个步骤。由于 ACS/CODH 是某些病原体微生物物质能量代谢的中心酶，对于该酶的研究可以为阐明相关微生物的假膜结肠炎/癌疾病的分子机理提供依据，并为抑制病原体的生长和疾病防治治疗的药物设计提供思路和理论依据。

位于金属酶第二配位环境中的非共价相互作用对酶的活性和选择性起到极重要的作用。具有功能性第二配位环境的金属酶模拟物的研究为探讨金属酶的催化机理提供有力的指导。肌红蛋白在肌肉组织中有储存氧气的功能，其能用于第二配位环境对非天然金属卟啉的功能和催化活性的研究。北京大学张俊龙课题组近期用 Mn^{III}-原卟啉 IX 替换天然血红素，首次研究了远端组氨酸对 Mn^{III}卟啉与 H_2O_2 反应及 ABTS 单电子氧化的影响[17]。单点和多点氨基酸突变实验证实，His64 通过与 H_2O_2 形成氢键促进其与活性中心 Mn 的配位；His43 在裂解 O—O 键以及形成高价态 Mn(Ⅳ)-oxo 中间体的过程中发挥重要作用；His29 因离活性中心 Mn 较远，对 H_2O_2 的活化影响较少。将 43 位 Phe 突变成 His 后，F43H 突变体对 H_2O_2 的活化以及 ABTS 的单电子氧化速率相比于野生型 Mn^{III}Mb 分别提高了 5 倍和 10 倍。该项工作不仅能有助于我们更好地深入理解金属酶活化小分子的机理，也为发展仿生催化剂提供了新思路。

铁离子结合蛋白 A（FbpA）是位于细胞质周质的铁转运蛋白，多存在于革兰氏阴性病原体中。首个流感嗜血杆菌（*Haemophilus influenzae*）中的 FbpA 晶体结

构显示 Fe^{3+}能与 FbpA 中的 Tyr195、Tyr196、Glu57 以及 His9 配位形成八面体配位构型。上海第二军医大学仲维清课题组报道的晶体结构显示，其他金属离子如 Hf^{4+}、Zr^{4+}以及 Ti^{4+}能以与 Fe^{3+}类似的配位方式与 FbpA 结合。最近，仲维清课题组的研究显示，Cu^{2+}也能与 *Neisseria gonorrhoeae* 中的 FbpA（NgFbpA）结合，结合常数高达 10^8L/mol[18]。oxo-Cu_2-NgFbgA 晶体结构显示 oxo-Cu_2 簇与铁的配位类似，直接与 Tyr195 及 Tyr196 结合，不同的是，一个铁原子与两个酪氨酸配位，而两个铜离子被双氧基桥连之后分别与一个氨基酸配位，结合特点与 Zr 及 Hf 离子簇与 FbpA 的配位相似，另外，Cu 不与 Glu 配位。该项工作可能为铜-氨基酸配合物的抗菌机理以及铜在生物体内的代谢平衡研究提供一定的启示。

阿尔茨海默病（Alzheimer’s disease，AD）是一种神经逐步退行性疾病，伴有过渡金属离子诱导引发的 β-淀粉样蛋白（Aβ）的沉积。设计能靶向金属-Aβ 的化学试剂是治疗该疾病的策略之一。硒蛋白是一组包含 21 个硒代半胱氨酸（Sec）的特殊蛋白质，由于 Sec 的存在，人们对于硒蛋白的研究通常集中在其调控氧化还原电位及清除活性氧物种的功能上。近期，深圳大学倪嘉缵和刘琼课题组报道了硒蛋白 P 的富组氨酸区域（SelP-H）以及硒代半胱氨酸突变为硫代半胱氨酸的硒蛋白 M’（SelM’）能够结合过渡金属离子并且能够调控 Zn^{2+}介导的 Aβ 沉积、ROS 产生以及神经毒性[19]。硫黄素 T（ThT）荧光实验以及透射电子显微镜显示这两种蛋白质能显著缓解锌离子与 Aβ 结合后对 Aβ 纤维化的抑制。同时，还能抑制锌与 Aβ 结合后引起的细胞毒性及 ROS 的产生。这些研究表明，SelP-H 和 SelM’在调节氧化还原以及金属动态平衡中可能发挥着重要作用，更有可能为治疗阿尔茨海默病的药物设计和优化提供有力的指导。

在幽门螺杆菌中，镍离子通过镍伴侣蛋白的相互作用进行传递，形成细菌内的镍平衡体系，对体内重要金属酶的成熟乃至细菌的致病机理至关重要。香港大学孙红哲等近年来在幽门螺杆菌镍伴侣蛋白的相互作用研究方面作出突出贡献。幽门螺杆菌 HypA 和 HypB 金属伴侣蛋白对细菌内镍铁氢化酶和脲酶的成熟起重要作用。体外实验表明，参与二者之间相互作用的氨基酸残基主要位于 HypA 蛋白由第一个 α-螺旋和第一个、第六个 β-折叠所形成的凹陷中，而 HypB 主要通过 N 端参与该相互作用[20]。HypA 单体通过和 HypB 单体相互作用，将镍传递给 HypB，后者结合镍形成二聚体，同时伴随 GTP 水解。活性状态下的 HypB 二聚体进一步将镍转运到下游的镍受体蛋白。SlyD 是参与氢化酶成熟的重要镍伴侣蛋白，且具有与其他过渡金属结合的能力。结构信息表明，SlyD 在结构上分为 PPIase 和 IF 两个功能域，前者具有异构酶活性，帮助目标蛋白折叠。SlyD 通过其 IF 功能域与 HypB 结合，将镍离子转运到 HypB，提高 HypB 作为 GTPase 水解酶的活性[21]。幽门螺杆菌脲酶的成熟需要四种伴侣蛋白：UreE、UreG、UreF 和 UreH。HypA 通过与 UreE 相互作用，参与脲酶金属活性中心的组装[22]。UreE 二聚体与

HypA 单体结合，其 C 端 158～170 个氨基酸残基对 HypA 的识别起重要作用。二者结合使 HypA 镍结合位点附近的结构发生变化，镍离子由 HypA 传递至 UreE。此外，UreE 和 UreG 之间的相互作用也被证实对脲酶的成熟至关重要。体外实验表明两种蛋白质可通过形成 2E-2G 或 2E-G 复合物发生相互作用，前者仅在 GTP 和镁离子存在的情况下形成[23]。2E-2G 复合物的形成使镍离子由 UreE 转运至 UreG，同时促进 GTP 与 UreG 结合。该研究首次揭示在脲酶成熟过程中镍在 HypA、UreE 和 UreG 之间的传递机理：apo-UreE 作为纽带从 HypA 蛋白获取镍离子，进而将镍转运至 UreG。

组氨酸因其功能多样性在生物化学研究中被广泛关注。其侧链的咪唑基团（pK_a～6.0）对周边环境中的质子较为敏感，且芳环中的氮原子易传递孤对电子到具有互变异构倾向的金属离子，这使得组氨酸成为酶活性中心和金属蛋白动态配位结合中的常见配体。孙红哲等利用生物信息学的研究方法，系统性地鉴定和表征了原核生物中组氨酸富集蛋白的生物功能[24]，以及含有组氨酸富集簇的金属蛋白的功能和金属配位特征[25]。通过对 675 种原核生物的蛋白质组进行组氨酸富集基序的搜索和分析，发现组氨酸富集蛋白在原核生物的蛋白质组中普遍存在，其出现频率与原核生物的栖息地相关，在根瘤菌和致病性革兰氏阴性菌中出现频率较高[24]。例如，在鲍氏不动杆菌（*Acinetobacter baumannii* ATCC17978）的阳离子转运蛋白中，发现一段含有 30 个氨基酸残基的序列中组氨酸的个数多达 25 个，且有 19 个连续的组氨酸残基。进一步功能分析表明绝大多数组氨酸富集蛋白与金属平衡相关。沼泽红假单胞菌中的铁硫结合蛋白（BFD）为分析发现的组氨酸富集蛋白。将该蛋白在大肠杆菌中过表达，发现表达 BFD 蛋白的大肠杆菌中镍和钴离子含量高出正常细菌 3～4 倍，且细菌生长情况更好，表明组氨酸富集蛋白 BFD 在细胞内可缓解金属离子的毒性。

除了组氨酸富集序列，组氨酸富集的蛋白三维结构信息在金属-蛋白配位研究中起到重要作用。孙红哲等利用 PDB 数据库中的蛋白质结构信息及生物信息学分析工具，成功鉴定出超过 1000 种含有组氨酸富集簇的非同源蛋白，其中绝大多数表现出与锌、铜、镍、铁等过渡金属结合的特征，并具有不同的配位构型及配体偏好[25]。在搜索中，组氨酸富集簇被定义为在形成空间团簇结构的氨基酸残基中至少有 3 个为组氨酸，且组氨酸所占比例超过团簇结构中氨基酸总数的 50%。利用此方法鉴定出的组氨酸富集蛋白多与微生物致病机理相关，表明此类蛋白可作为潜在金属药物靶点进行进一步深入研究，同时分析结果为药物设计提供了大量有效的信息。此类研究方法可拓展到其他单个氨基酸富集蛋白的搜索及功能分析，并有助于进一步理解金属蛋白序列、结构与其生物功能的关系。

过渡金属在自然界中广泛存在，但在生物体内其含量往往处于痕量水平。如何在蛋白质组学层面上分离以及定量表征与过渡金属结合的蛋白质对于理解金属

的作用机理是一个富有挑战性的课题。目前，已经有多重高效的方法来检测各种金属蛋白，如激光烧蚀-电感耦合等离子体质谱法（LA-ICP-MS）、电喷雾质谱法（ESI-MS）、X 射线荧光光谱法（XRF）以及金属亲和色谱法（IMAC）。暨南大学孙雪松课题组于 2013 年报道了利用钴、镍金属亲和色谱（IMAC）在蛋白质组的水平下研究了肺炎链球菌中能与钴、镍两种金属结合的蛋白质和肽段[26]。通过 IMAC 与轨道阱质谱（LTQ-Orbitrap MS）联用，成功分离出 208 种潜在钴蛋白和 223 种潜在镍结合蛋白。此外，研究发现钴、镍更倾向与组氨酸和甲硫氨酸结合，并不是通常所认为的与半胱氨酸结合。这些研究结果为进一步研究微生物毒性的金属稳态以及分子机理提供了可靠的方向。

过渡金属汞在人体内具有高度的神经毒性和肾毒性。同年，中国科学院生态环境研究中心江桂斌和何滨课题组报道了利用二维高效液相色谱-紫外光谱-电感耦合等离子体质谱技术（2D-HPLC-UV-ICP-MS）分离检测存在于人血浆中的汞结合蛋白[27]。此方法可克服 HPLC 不能检测未知蛋白质的缺陷。他们首先利用 2D-HPLC 获得了一种特殊的汞结合蛋白，然后联用线性离子阱-傅里叶变换回旋共振质谱仪（LTQ-FT）对其进行鉴定。研究数据结果表明该汞结合蛋白为人血清白蛋白 HAS，并且它们之间存在着两种强相互作用模式。这项研究结果将有助于解释汞在人体中的代谢毒性机理。

虽然 HPLC 在蛋白质的分离与检测中起到了积极的作用，但其在分离某些蛋白质中仍然很难得到比较理想的结果，因此，新技术的开发将会有助于人类在蛋白质组的水平上来认识与理解各种机理。2015 年，中国科学院高能物理研究所李玉锋等利用二维电泳联用同步辐射 X 荧光分析法（2-DE-SR-XRF）对酵母细胞中的硒蛋白进行识别与定量研究[28]。因硒蛋白的含量极低，所以具有高分辨率、高信噪比、低检出限的二维电泳特别适合于硒蛋白的研究。而在金属蛋白的定量检测中，同步辐射 X 荧光分析的低分辨率、小的空间分辨率以及低的样品损伤率成为原位定量检测的合适选择。李玉锋等通过此方法在凝胶上共检测出 157 个蛋白分布点，覆盖了凝胶上的绝大多数硒蛋白，经计算硒含量高达 126.56μg/g。因此，利用 SR-XRF 技术在凝胶上对金属蛋白进行检测，结合下游 ESI-MS 技术对含有金属的蛋白质/肽段进行分析，将成为金属蛋白鉴定的有效手段。

6.3　我国学者利用金属组学技术研究金属药物的进展

如第 3 章所述，金属组学和金属蛋白质组学提供了大量有效的研究工具，在极大程度上推进了金属药物作用机理的研究，并为新型金属药物的研发提供了重要线索。我国金属组学在金属药物领域的研究进展主要体现在两方面：一是新型金属药物的设计合成及应用；二是金属药物的作用机理研究。

中山大学巢晖和计亮年课题组在设计合成具有抗肿瘤活性的新型钌多吡啶配合物方面具有长期工作基础，并作出突出贡献。巢晖等设计合成了四种钌(Ⅱ)多吡啶非对称配合物，对肿瘤细胞表现出高选择性[29]。其中化合物$[Ru(dip)_2(PAIDH)]^{2+}$（dip=4, 7-diphenyl-1, 10-phenanthroline，PAIDH=2-pyridyl-1*H*-anthra[1，2-d]imidazole-6, 11-dione）表现出最高的细胞毒性。该化合物可特异性聚集在Hela细胞的线粒体中，同时伴随细胞内活性氧物质生成，线粒体膜电势去极化，以及Bcl-2 和半胱天冬酶家族蛋白的激活，表明化合物可诱导线粒体介导的癌细胞凋亡。最近，该课题组通过比较一系列钌多吡啶化合物和相应的钌环金属化合物对肿瘤细胞的抑制作用，发现环金属化合物因其较强的分子疏水性、有效的细胞吸收、细胞核靶向性以及强DNA结合能力表现出更高的细胞毒性，并可作为DNA转录抑制剂[30]。该研究结果表明环金属化反应可作为通用手段显著提高钌多吡啶配合物的抗肿瘤活性。

光动力治疗是一种具有高选择性的非侵入性癌症治疗方法，但现有光动力治疗试剂往往具有低水溶性、弱光稳定性以及对肿瘤细胞的低选择性等缺陷。为了解决上述问题，巢晖等设计合成了三种带有高正电荷的钌多吡啶配合物，可作为溶酶体靶向双光子光动力试剂[31]。三种化合物均具有高水溶性、高单线态氧$^1O_2$量子产量、高光稳定性以及低暗细胞毒性，通过细胞内吞作用特异性地聚集于细胞溶酶体。其中取代基为$N(CH_3)_3$的化合物在800nm波长光照射下对三维 Hela多细胞肿瘤球表现出极强的光毒性，具有较强的应用前景。这也是第一例有报道的钌配合物适用于溶酶体靶向双光子光动力治疗。

铱配合物由于其优异的光化学和光物理性质在抗肿瘤及细胞成像方面受到广泛关注。中山大学毛宗万和谭彩萍课题组设计合成新型磷光铱配合物作为溶酶体靶向的光动力治疗试剂[32]。新型铱配合物的咔啉配体具有可质子化/去质子化位点，使配合物具有pH响应的磷光和单线态氧（$^1O_2$）特性，并能够特异性地对细胞中的溶酶体进行标记。在可见光（425nm）的照射下，这类铱配合物表现出对肿瘤细胞高选择性的光毒性。进一步机理研究表明，在光照条件下铱配合物能够诱导细胞内大量活性氧物质的产生，引起溶酶体膜通透化，将溶酶体内的组蛋白酶释放到细胞质，进而诱导癌细胞凋亡。另外，此类铱配合物良好的磷光特性可实现在光动力治疗过程中对溶酶体的实时监控，从而更好地评价光动力治疗的效果。

钒配合物作为潜在的糖尿病治疗试剂受到广泛关注，但其作用机理尚未得到全面解释。北京大学杨晓改课题组研究了钒复合物抗脂解作用的发生机理，并通过不同浓度药物检测找到了抑制脂解作用效果较好的化合物 bis(acetylacetonato)-oxovanadium (Ⅳ)［$VO(acac)_2$］，证明了钒化合物在抗糖尿病方面具有潜在的应用价值[33]。脂肪细胞脂解作用导致的血浆游离脂肪酸水平的升高，是患Ⅱ型糖尿病

的主要危险因素。研究中阐明了金属钒复合物抗糖尿病作用的发生机理，包括对葡萄糖和脂类代谢作用的抑制。通过不同浓度药物效果检测，三种钒复合物都在不同程度上延缓了脂解作用，抑制了脂类的分解。其中，$VO(acac)_2$（100～400μmol/L）效果最好，在 4h 的治疗后，脂解作用降低到对照组的 20%～60%。钒化合物的抗脂解效果进一步表现在磷酸化 HSL 位于 Ser660 位点的降低和磷酸化周脂素的降低，表明了钒化合物利用 P13K、Akt 抑制因子减少脂解作用水平，但只有 Akt 传递路径促进了钒复合物的抗脂解作用。另外，$VO(acac)_2$ 还可以通过在 G1/S 期高度激活 ERK 传递路径，阻止人体肝癌细胞的细胞周期的进行。这些研究工作为未来糖尿病及其相关癌症的预防和治疗提供了十分重要的思路，有助于研究糖尿病与其相关癌症的作用机理间的联系以及发展多疾病的协同治疗方案。

北京大学杨晓达课题组研究了几类钒配合物对过氧化物酶体增生激活受体蛋白（PPARs）的影响，尤其是针对抗糖尿病药物重要靶点 PPARγ[34]。实验数据表明钒化合物处理后的 NIT-1 β-胰腺细胞，促进了 PPARγ 受体的激活以及 PPARγ 蛋白的分泌水平。在进一步药理机理研究过程中发现，钒复合物并未促进 PPARγ 的转录过程，但是改善了炎症刺激器 TNF-α/IL-6 对化合物的降解，并能够诱导 PPARγ 蛋白与热激蛋白（Hsp60）的结合，而 PPARγ-Hsp60 的相互作用可抑制 PPARγ 的降解使其含量升高。此外，钒化合物可调节 PPARγ 的磷酸化过程。该研究总结了钒化合物进入细胞后的应答过程，首次阐述了 PPARγ 蛋白的转录、降解、与 Hsp60 结合等机理，并证明了钒化合物对 PPARγ 磷酸化的调节作用。这些研究表明，钒化合物可以作为 PPARγ 蛋白的新调节分子，在 PPARα/γ 蛋白抗糖尿病作用中扮演着重要角色。这为未来钒类药物的抗糖尿病研究提供了重要的理论基础。

金属铋是一种对人体几乎无毒的重金属，作为药物已有 200 多年历史。基于铋剂的疗法在临床上对幽门螺杆菌感染具有很好的疗效，然而其具体的作用机理尚未得到全面的阐释。香港大学孙红哲课题组长期致力于铋类药物抑制幽门螺杆菌作用机理的探索。其研究结果表明，铋与幽门螺杆菌中重要蛋白靶点如 HspA、HypB 结合[35-37]，诱导蛋白聚合态发生变化，进而干扰蛋白功能。中山大学葛瑞光课题组报道铋类药物可抑制幽门螺杆菌翻译延伸因子 Tu 蛋白（Ef-Tu）的活性，使其 GTPase 酶活性、核苷酸结合能力及伴侣蛋白活性降低[38]。孙红哲等利用金属螯合亲和层析法与高通量液质联用技术对铋类药物在幽门螺杆菌中结合蛋白的生物配位特征进行系统性分析，对应于幽门螺杆菌中 166 种蛋白的 300 多个铋结合肽段被成功鉴定出来[39]。生物信息学分析表明，铋对含有半胱氨酸和组氨酸的肽段具有高选择性，与肽段结合表现出 CX_nC、CX_nH 和 HX_nH 的基序模式。GO 富集分析显示，鉴定出的假定铋结合蛋白富集于几类重要生物功能，包括转录、

翻译、氧化还原、蛋白质折叠、过渡金属结合；几类功能中任一关键蛋白的功能异常均可能影响幽门螺杆菌的存活。最近，孙红哲等利用系统生物学的方法进一步揭示了铋类药物选择性作用于特定病原细菌而对人体细胞几乎无毒的机理[40]。研究证实，在哺乳动物细胞内，谷胱甘肽和多药耐药转运蛋白调节铋在细胞内的自推进式排出机理，从而有效避免了铋在人体内产生急性毒性。而幽门螺杆菌中缺少谷胱甘肽，这成为铋类药物选择性作用于该病原菌的关键因素。

砷作为类金属，是常见的致癌物，同时又作为临床化学治疗试剂得到广泛应用。上海交通大学陈竺等在三氧化二砷应用于急性早幼粒细胞白血病临床治疗的机理方面开展了大量研究工作，并作出突出贡献。最近，浙江中医药大学陈哲等以三氧化二砷为基础，探索治疗人类多发性骨髓瘤的新方法[41]。研究发现三氧化二砷和隐丹参醌（cryptotanshinone，CPT）具有协同作用，抑制人类多发性骨髓瘤 U266 细胞的活性。隐丹参醌为丹参根部分离提取出的二萜苯醌类化合物，具有抗炎、抗肿瘤、抗血管新生等活性。单独使用三氧化二砷或隐丹参醌对 U266 细胞的抑制效果并不显著，但较低浓度的三氧化二砷与隐丹参醌联合使用可显著抑制 U266 细胞的活性。在联合用药条件下，与细胞凋亡相关的蛋白质如聚 ADP 核糖聚合酶（PARP）、半胱天冬酶-3 和半胱天冬酶-9 表达量显著增强，而与细胞存活相关的蛋白质如 Bcl-2 和生存素蛋白表达受到抑制，表明药物通过线粒体调节的细胞凋亡通路诱导细胞凋亡，且进一步研究表明 JNK 通路在其中起到关键作用。后续研究需要在体内环境下评估三氧化二砷和隐丹参醌的协同作用效果，该联合用药方法对多发性骨髓瘤的治疗具有潜在的临床应用前景。

阿尔茨海默病是由乙型淀粉样蛋白（β-amyloid protein，Aβ）不正常累积和聚合诱发的神经变性疾病。Aβ 通常是由 39～43 个氨基酸残基组成的多肽，由亲水的 N 端和疏水的 C 端组成。其中具有高亲和力的金属结合位点位于 Aβ 的 N 端，与一系列过渡金属如铜、锌、铁结合，加速 Aβ 纤维化的形成并调控其毒性。中国科学技术大学刘扬中等设计螯合作用疗法治疗阿尔茨海默病，并对铂邻二氮杂菲化合物［Pt(phen)］和金属结合的乙型淀粉蛋白肽段（［M^{2+}-A$\beta_{1\sim16}$］，M=Cu，Zn）之间相互作用的机理进行进一步的研究[42]。通过 HPLC、EPR、ESI-MS 等方法的综合分析表明，［Pt(phen)］与 Aβ 的金属配位点结合，并影响铜、锌在 Aβ 肽段中的结合模式。在低 pH 条件下，［Pt(phen)］与 Aβ 肽段结合可促进铜、锌离子的释放。该研究表明［Pt(phen)］影响过渡金属与 Aβ 的结合，可抑制金属诱导的 Aβ 蛋白聚集，在缓解阿尔茨海默病上有潜在的临床应用价值。

6.4　结论与展望

我国金属组学研究紧跟国际金属组学研究步伐，如我国学者在相应的学术期

刊及国际会议中均担任了重要职务，另外，我国学者已在金属组学研究某些方面起到引领作用，如首先编著了金属组学与蛋白质组学学术专著、成功主办国际金属组学会议、首次提出纳米金属组学及环境金属组学概念等。纳米金属组学与近年来兴起的纳米生物效应研究紧密相关[43，44]，可为纳米生物效应研究提供强有力的工具[45]，而同步辐射技术可以在纳米金属组学研究中发挥其独特作用[46]。

随着越来越多的国内学者，特别是原子光谱、基因组学、蛋白质组学及代谢组学等领域的学者越来越多地与金属组学领域的学者进行交叉合作，我国金属组学研究有望在国际金属组学研究领域占有更重要的地位。

（王宇传　李玉锋）

参 考 文 献

[1] 江桂斌，何滨. 金属组学及其研究方法与前景. 中国科学基金，2005，19（3）：151-155.

[2] 金伟，牟颖，金钦汉. 金属组学、代谢组学及其它. 理化检验-化学分册，2005，41（4）：296-299.

[3] http://www.ihep.ac.cn/news/news2008/080504.htm/.

[4] 李玉锋，高愈希，陈春英，等. 金属组学：高通量分析技术进展与展望. 中国科学 B 辑：化学，2009，39（7）：580-589.

[5] 葛瑞光，陈卓，孙红哲. 金属组学：研究生命体系中金属离子的前沿交叉学科. 中国科学 B 辑：化学，2009，39（7）：590-606.

[6] 朱小飞，谭相石. 金属组学：Wood-Ljungdahl 通路中的金属蛋白/金属酶. 中国科学 B 辑：化学，2009，39（7）：607-619.

[7] Chen C，Chai Z，Gao Y. Nuclear Analytical Techniques for Metallomics and Metalloproteomics. Cambridge：RSC Publishing，2010.

[8] Li Y F，Gao Y，Chai Z，et al. Nanometallomics：An emerging field studying the biological effects of metal-related nanomaterials. Metallomics，2014，6（2）：220-232.

[9] http://metallomics.antpedia.com/.

[10] http://www.rsc.org/journals-books-databases/about-journals/metallomics/.

[11] Haraguchi H. Metallomics as integrated biometal science. J Anal At Spectrom，2004，19（1）：5-14.

[12] Koppenaal D W，Hieftje G M. Metallomics-the future of atomic spectroscopy? J Anal At Spectrom，2007，22（2）：111.

[13] Jakubowski N，Lobinski R，Moens L. Metallobiomolecules. The basis of life，the challenge of atomic spectroscopy. J Anal At Spectrom，2004，19（1）：1-4.

[14] Sun H. Metallomics in China. Metallomics，2013，5：782-783.

[15] http://www.antpedia.com/news/48/n-1253048.html/.

[16] Zhu X，Tan X. Metalloproteins/metalloenzymes for the synthesis of acetyl-CoA in the Wood-ljungdahl pathway. Sci China Chem，2009，39（7）：607-619.

[17] Cai Y B，Li X H，Jing J et al. Effect of distal histidines on hydrogen peroxide activation by manganese reconstituted myoglobin. Metallomics，2013，5（7）：828-835.

[18] Chen W，Ye D，Wang H，et al. Binding of oxo-Cu2 clusters to ferric ion-binding protein A from Neisseria

gonorrhoeae：A structural insight. Metallomics，2013，5（10）：1430-1439.

[19] Du X，Li H，Wang Z，et al. Selenoprotein P and selenoprotein M block Zn^{2+} -mediated Abeta42 aggregation and toxicity. Metallomics，2013，5（7）：861-870.

[20] Xia W，Li H，Yang X，et al. Metallo-GTPase HypB from *Helicobacter pylori* and its interaction with Nickel chaperone protein HypA. J Biol Chem，2011，287（9）：6753-6763.

[21] Cheng T，Li H，Yang X，et al. Interaction of SlyD with HypB of *Helicobacter pylori* facilitates nickel trafficking. Metallomics，2013，5（7）：804-807.

[22] Yang X，Li H，Cheng T，et al. Nickel translocation between metallochaperones HypA and UreE in *Helicobacter pylori*. Metallomics，2014，6（9）：1731-1736.

[23] Yang X，Li H，Lai T P，et al. UreE-UreG complex facilitates nickel transfer and preactivates GTPase of UreG in *Helicobacter pylori*. J Biol Chem，2015，290（20）：12474-12485.

[24] Cheng T，Xia W，Wang P，et al. Histidine-rich proteins in prokaryotes：Metal homeostasis and environmental habitat-related occurrence. Metallomics，2013，5（10）：1423-1429.

[25] Cun S，Lai Y T，Chang Y Y，et al. Structure-oriented bioinformatic approach exploring histidine-rich clusters in proteins. Metallomics，2013，5（7）：904-912.

[26] Sun X，Yu G，Xu Q，et al. Putative cobalt- and nickel-binding proteins and motifs in *Streptococcus pneumoniae*. Metallomics，2013，5（7）：928-935.

[27] Yun Z，Li L，Liu L，et al. Characterization of mercury-containing protein in human plasma. Metallomics，2013，5（7）：821-827.

[28] Zhao J，Pu Y，Gao Y，et al. Identification and quantification of seleno-proteins by 2-DE-SR-XRF in selenium-enriched yeasts. J Anal At Spectrom，2015，30：1408-1413.

[29] Qian C，Wang J Q，Song C L，et al. The induction of mitochondria-mediated apoptosis in cancer cells by ruthenium (Ⅱ) asymmetric complexes. Metallomics，2013，5（7）：844-854.

[30] Huang H，Zhang P，Chen H，et al. Comparison between polypyridyl and cyclometalated ruthenium (Ⅱ) complexes：Anticancer activities against 2D and 3D cancer models. Chemistry，2015，21（2）：715-725.

[31] Huang H，Yu B，Zhang P，et al. Highly charged ruthenium (Ⅱ) polypyridyl complexes as lysosome-localized photosensitizers for two-photon photodynamic therapy. Angew Chem 2015，127（47）：14255-14258.

[32] He L，Li Y，Tan C P，et al. Cyclometalated iridium (iii) complexes as lysosome-targeted photodynamic anticancer and real-time tracking agents. Chem Sci，2015，6（10）：5409-5418.

[33] Liu J C，Yu Y，Wang G，et al. Bis (acetylacetonato)-oxovanadium (iv)，bis (maltolato)-oxovanadium (iv) and sodium metavanadate induce antilipolytic effects by regulating hormone-sensitive lipase and perilipin via activation of Akt. Metallomics，2013，5（7）：813-820.

[34] Zhao P，Yang X. Vanadium compounds modulate PPARgamma activity primarily by increasing PPARgamma protein levels in mouse insulinoma NIT-1 cells. Metallomics，2013，5（7）：836-843.

[35] Cun S，Li H，Ge R，et al. A histidine-rich and cysteine-rich metal-binding domain at the C terminus of heat shock protein A from *Helicobacter pylori*：Implication for nickel homeostasis and bismuth susceptibility. J Biol Chem，2008，283（22）：15142-15151.

[36] Cun S，Sun H. A zinc-binding site by negative selection induces metallodrug susceptibility in an essential chaperonin. Proc Natl Acad Sci USA，2010，107（11）：4943-4948.

[37] Xia W，Li H，Sun H. Functional disruption of HypB，a GTPase of *Helicobacter pylori*，by bismuth. Chem

Commun，2014，50：1611-1614.

[38] Wang D，Luo B，Shan W，et al. The effects of EF-Ts and bismuth on EF-Tu in Helicobacter pylori：Implications for an elegant timing for the introduction of EF-Ts in the elongation and EF-Tu as a potential drug target. Metallomics，2013，5（7）：888-895.

[39] Wang Y，Tsang C N，Xu F，et al. Bio-coordination of bismuth in *Helicobacter pylori* revealed by immobilized metal affinity chromatography. Chem Comm，2015，51：16479-16482.

[40] Hong Y，Lai Y T，Chan G C，et al. Glutathione and multidrug resistance protein transporter mediate a self-propelled disposal of bismuth in human cells. Proc Natl Acad Sci USA，2015，112（11）：3211-3216.

[41] Liu P，Xu S，Zhang M，et al. Anticancer activity in human multiple myeloma U266 cells：Synergy between cryptotanshinone and arsenic trioxide. Metallomics，2013，5（7）：871-878.

[42] Ma G，Wang E，Wei H，et al. $PtCl_2$（phen）disrupts the metal ions binding to amyloid-beta peptide. Metallomics，2013，5（7）：879-887.

[43] Wang J，Bai R，Yang R，et al. Size-and surface chemistry-dependent pharmacokinetics and tumor accumulation of engineered gold nanoparticles after intravenous administration. Metallomics，2015，7（3）：516-524.

[44] Wang B，Feng W，Zhao Y，et al. Metallomics insights for *in vivo* studies of metal based nanomaterials. Metallomics，2013，5（7）：793-803.

[45] Benetti F，Bregoli L，Olivato I，et al. Effects of metal (loid)-based nanomaterials on essential element homeostasis：The central role of nanometallomics for nanotoxicology. Metallomics，2014，6（4）：729-747.

[46] Li Y，Li Y F，Zhao J，et al. Accumulation and transformation of nanomaterials in ecological model organisms investigated by using synchrotron radiation techniques. J Anal At Spectrom，2015，30（10）：2038-2047.

（O-6434.01）
封面图片设计：谢宇恒

现代化学基础丛书 37 金属组学

- 国内首部系统介绍金属组学研究领域的专著
- 中国科学院院士柴之芳研究团队倾力编纂
- 包含纳米金属组学、环境金属组学最新方向
- 涉及国内外金属组学研究一线学者科研进展

www.sciencep.com
ISBN 978-7-03-048241-9



科学出版社•科学化工分社
电　话：010-64001695
E-mail: zhangshuxiao@mail.sciencep.com
销售分类建议：化学

定　价：50.00元